

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATO REZENDE YOUNG BLOOD

CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL E DESENVOLVIMENTO DA
ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA

CURITIBA

2012

RENATO REZENDE YOUNG BLOOD

CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL E DESENVOLVIMENTO DA
ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Louise Larissa May De Mio

Co-orientadora: Dra. Luciane Roswalka

CURITIBA

2012

B651 Blood, Renato Rezende Young

Caracterização do agente causal e desenvolvimento da antracnose do caquizeiro na Região Metropolitana de Curitiba / Renato Rezende Young Blood. – Curitiba, 2012-11-21
58 f.

Orientador: Louise Larissa May de Mio

Co-orientador: Luciane Roswalka

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal

Antracnose . 2. Fungos na agricultura. 3. Caqui – Doenças e pragas. I. May de Mio, Louise Larissa. II. Roswalka, Luciane. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. IV. Título

CDU 632:634.45



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

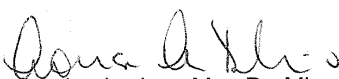



PARECER

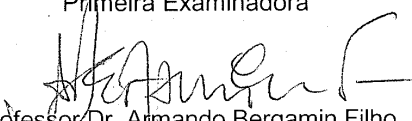
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **RENATO REZENDE YOUNG BLOOD**, sob o título **“CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL E DESENVOLVIMENTO DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA”**, para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.


Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Dissertação.

Curitiba, 24 de Setembro de 2012.


Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa


Professora Dra. Maristella Dalla Pria
Primeira Examinadora


Professor Dr. Armando Bergamin Filho
Segundo Examinador


Professor Dr. Mauro Brasil Dias Tofanelli
Terceiro Examinador


Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Presidente da Banca e Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando e protegendo cada dia da minha vida.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso.

À professora orientadora Louise Larissa May De Mio, pelo incentivo, confiança, ajuda nos momentos críticos e, sobretudo, pela sua dedicação.

À Dr. Luciane Roswalka, pela co-orientação, amizade e ajuda fundamental durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos e amizade.

Aos estagiários e amigos do LEMID, por toda amizade e colaboração, nestes anos de convívio.

À SEAB-PR, instituição na qual trabalho, pelo auxílio para que eu terminasse o curso de mestrado.

Ao SIMEPAR pela disponibilidade e agilidade em fornecer os dados climáticos utilizados neste estudo

À minha família, por estar sempre ao meu lado, por toda ajuda e amor incondicional, sem os quais este trabalho não teria chegado ao fim.

Aos produtores Edegar José Berton e Elizabeth Guedes de Freitas Costa, por total colaboração, fornecendo os pomares para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

O caquizeiro é conhecido pela rusticidade e produzido principalmente pela agricultura familiar no Paraná. A partir de 2006, danos de até 100% vêm ocorrendo no município de Campina Grande do Sul, principal produtor no estado. O gênero *Colletotrichum spp.* agente etiológico da antracnose vem sendo considerado o possível causador da queda de frutos imaturos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade, caracterizar molecular, cultural e fisiologicamente a espécie deste fungo e avaliar a antracnose do caquizeiro em condições de campo. A partir de ramos e frutos sintomáticos coletados em pomares de caqui Fuyu e Kakimel foram obtidos 16 isolados. Desses, 13 isolados foram inoculados com discos de micélio em frutos e ramos e 3 isolados com suspensão de conídios em ramos. Todos os isolados inoculados em ramos e frutos demonstraram-se patogênicos, com o período de incubação nos frutos de 3 a 4 dias para isolados mais agressivos e nos ramos, os isolados inoculados com suspensão apresentaram período de incubação de 3 dias. Pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) constatou-se que 93% dos isolados pertencem a espécie *Colletotrichum horii*. As colônias apresentaram no verso, coloração acinzentada uniforme e aspecto aveludado. No reverso eram escuras e concêntricas, não havendo esporulação. Em meio BDA, os patógenos desenvolveram-se entre as temperaturas de 11 a 31°C, sendo o crescimento favorecido a 25°C. Na avaliação do desenvolvimento da antracnose a campo, o experimento foi conduzido durante dois ciclos, 2010/11 e 2011/12, em dois pomares localizados no município de Campina Grande do Sul, região metropolitana de Curitiba-PR. O primeiro com a cultivar Fuyu, cultivo orgânico e o segundo, com a cultivar Kakimel, cultivo convencional. Em cada pomar foram selecionadas, aleatoriamente, 10 plantas, onde foram marcados, com fitas coloridas, 10 ramos do ano, distribuídos aleatoriamente ao redor da copa. Nestes ramos avaliou-se a cada 15 dias, a incidência de antracnose nas folhas, nos frutos e no ramo. Além disso, a cada 15 dias, todos os frutos caídos com sintomas da doença foram contados até o dia da colheita. Na colheita, todos os frutos das plantas marcadas foram contabilizados para determinação da produção total de cada planta. Nos dois ciclos foi observada a queda de frutos com sintomas da doença. Para cultivar Fuyu a queda de frutos ocorreu a partir de janeiro até a colheita e danos foram de 7,5% e 19,5%, para primeiro e segundo ciclo, respectivamente. Na cultivar Kakimel, a queda ocorreu no mesmo período e os danos foram de 4,31% para o primeiro ciclo e 5,93% para o segundo. Em frutos verdes colhidos aos 90, 120 e 150 dias após a plena floração, realizou-se a técnica "over night freezing" para observação da infecção latente de *Colletotrichum*. Em pós-colheita, a maior incidência da doença foi verificada na cultivar Fuyu, sendo que após 18 dias, a 25°C, frutos não desinfestados apresentaram, incidência de 4 e 7% em 2010/11 e 2011/12, respectivamente.

Palavras-chave: *Colletotrichum horii*, patogenicidade, infecção latente, pós-colheita

ABSTRACT

The persimmon is known for hardiness and mainly produced by family farmers in Parana. From 2006, up to 100% damage occurring in the city of Campina Grande do Sul, the main producer in the state. The genus *Colletotrichum* spp. etiologic agent of anthracnose has been considered the possible causes immature fruit drop. This study aimed to evaluate the pathogenicity, molecular characterization, cultural and physiologically this fungus species and evaluate the persimmon anthracnose under field conditions. From symptomatic branches and fruits collected in orchards of Fuyu persimmon and Kakimel 16 isolates were obtained. Of these, 13 isolates were inoculated with mycelial discs in fruits and branches and 3 isolates with spore suspension in branches. All isolates showed in stems and fruits themselves pathogenic, the incubation period in the fruits of 3 to 4 days to most aggressive isolates and branches, the isolates were inoculated with a suspension showed an incubation period of 3 days. By the method of polymerase chain reaction (PCR) revealed that 93% belong to species *Colletotrichum* Horii. The colonies presented overleaf, grayish uniform and velvety. On the reverse were dark and concentric, with no sporulation. On PDA medium, the pathogens have developed temperatures between 11-31°C, being the favored growth at 25°C. In assessing the development of anthracnose in the field, the experiment was conducted during two cycles, 2010/11 and 2011/12, in two orchards located in Campina Grande do Sul, metropolitan region of Curitiba-PR. The first with cultivar Fuyu, organic farming and the second, with the cultivar Kakimel, conventional cultivation. In each orchard were randomly selected 10 plants, which were marked with colored ribbons, 10 branches of the year, randomly distributed around the crown. In these groups was evaluated every 15 days, the incidence of anthracnose on the leaves, fruit and branch. Moreover, every 15 days, all fallen fruit showing symptoms of disease were counted until the day of harvest. At harvest, all fruit plants marked were counted to determine the total production of each plant. In the two cycles was observed fruit drop disease symptoms. To cultivate Fuyu fruit drop occurred from January to harvest and damage were 7.5% and 19.5% for first and second cycle, respectively. In cultivating Kakimel, the decrease occurred in the same period and the damage was 4.31% for the first cycle and 5.93% for the second. In unripe fruits harvested at 90, 120 and 150 days after full bloom, there was a technical "freezing over night" to observe the latent *Colletotrichum*. In post-harvest, the highest incidence of the disease was found in the cultivar Fuyu, and after 18 days at 25 °C, fruit disinfested not presented an incidence of 4 to 7% in 2010/11 and 2011/12 respectively.

Keywords: *Colletotrichum horii*, pathogenicity, latent infection, post-harvest

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	TESTE DE PATOGENICIDADE COM SUPENSÃO DE CONÍDIOS (10^4), EM RAMOS DE CAQUIZEIRO. A - INFECÇÃO SEM FERIMENTO. B - CRESCIMENTO DO PATÓGENO DO RAMO DO ANO PARA O RAMO DE UM ANO. C - LESÃO ESPORULADA EM FOLHA DE CAQUIZEIRO.....	32
FIGURA 2-	INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM MUDAS DE CAQUIZEIRO "FUYU". A - CANCRO APÓS 5 DIAS DA INOCULAÇÃO. B- RAMO ANELADO PELO PATÓGENO, COM FOLHAS MURCHAS. C - RAMO MORTO PELO ANELAMENTO 15 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO.....	34
FIGURA 3-	INOCULAÇÃO DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM FRUTOS DE CAQUI DA CULTIVAR FUYU 6 DIAS APÓS INOCULAÇÃO. A - COM FERIMENTO, B - SEM FERIMENTO.....	35
FIGURA 4-	INCIDÊNCIA DE ANTRACNOSE EM TESTE DE AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM FRUTOS DE CAQUI. A - ISOLADOS DE RAMO, INOCULAÇÃO COM FERIMENTO. B - ISOLADOS DE RAMO, INOCULAÇÃO SEM FERIMENTO. C - ISOLADOS DE FRUTO, INOCULAÇÃO COM FERIMENTO (MAIOR AACPD COM FERIMENTO). D - ISOLADOS DE FRUTO, INOCULAÇÃO SEM FERIMENTO (MAIOR AACPD COM FERIMENTO). E - ISOLADOS DE FRUTO, INOCULAÇÃO COM FERIMENTO (MENOR AACPD COM FERIMENTO). F - ISOLADOS DE FRUTO, INOCULAÇÃO SEM FERIMENTO (MENOR AACPD COM FERIMENTO).....	36

FIGURA 5-	CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DE VERSO E REVERSO DOS ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM MEIO BDA. A- Co 02-CGS. B- Co 03-CGS. C- Co 04-CGS. D- Co 06-CGS. E- Co 07-LP. F- Co 09-CGS. G- Co 10-CGS. H- Co 11-BS. I- Co 13-BS. J- Co 14-QB. K- Co15-CGS. L- Co 16-CGS. M- Co 17-CGS. N- Co 18-LP.....	38
FIGURA 6-	CRESCIMENTO MICELIAL, REPRESENTADO PELO DIÂMETRO DE COLÔNIAS, DE 4 ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp., DE CAQUIZEIRO, EM MEIO BDA, APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO REALIZADO EM TRÊS ENSAIOS DE TEMPERATURAS: NO PRIMEIRO 6, 11, 21, E 31°C, NO SEGUNDO 15, 18 E 25°C E NO TERCEIRO 20 E 30°C (CULTURAS EM AUSÊNCIA DE FOTOPERÍODO).....	39
FIGURA 7-	DENDROGRAMA FILOGENÉTICO BASEADO NA ANÁLISE “NEIGHBOUR-JOINING” COM BASE NA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum</i> spp. E 6 ISOLADOS REFERÊNCIA DE <i>C. horri</i> . VALORES DE BOOTSTRAP (1.0000 REAMOSTRAGENS).....	41
FIGURA 8-	QUEDA DE FRUTOS ASSINTOMÁTICOS (Nº) NOS 10 RAMOS MARCADOS, NAS 10 PLANTAS SELECIONADAS. A. FUYU, CICLO 2010/11; B. FUYU, CICLO 2011/12. C. KAKIMEL, CICLO 2010/11; D. KAKIMEL, CICLO 2011/12.....	42
FIGURA 9-	QUEDA DE FRUTOS COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE (Nº), NAS 10 PLANTAS SELECIONADAS. A. FUYU, CICLO 2010/11; B. FUYU, CICLO 2011/12. C. KAKIMEL, CICLO 2010/11; D. KAKIMEL, CICLO 2011/12.....	43

FIGURA 10-	INCIDÊNCIA DE SINAIS DE <i>Colletotrichum spp.</i> EM FLORES DE CAQUI FUYU. A E B. INCIDÊNCIA NO OVÁRIO. C. INCIDÊNCIA NA BASE DAS SÉPALAS.....	44
FIGURA 11-	NÚMERO DE FLORES COM INCIDÊNCIA DE ANTRACNOSE, EM 10 FLORES AVALIADAS EM 10 ÁRVORES MARCADAS DAS CULTIVARS FUYU E KAKIMEL.....	44
FIGURA 12-	FRUTOS DE CAQUI COM SINAIS DE <i>Colletotrichum spp.</i> APÓS SEREM SUBMETIDOS DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL E CONGELAMENTO POR 15 HORAS E ACONDICIONADOS EM CÂMARA ÚMIDA A 25°C ±2 E FOTOPERÍODO DE 12 HORAS, APÓS 5 DIAS, PARA EXPRESSÃO DA INFECÇÃO LATENTE. A. CULTIVAR FUYU. B. CULTIVAR KAKIMEL.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	TRATAMENTOS FITOSSANITÁRIOS REALIZADOS NO POMAR DA CULTIVAR KAKIMEL NOS CICLOS DE 2010/11 E 2011/12.....	29
TABELA 2-	ISOLADOS DE <i>Colletotrichum spp.</i> DE CAQUIZEIRO PROVENIENTES DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA-PR.....	31
TABELA 3-	TABELA 3 - AVALIAÇÃO DE TESTE DE PATOGENICIDADE, COM SUSPENSÃO DO PATÓGENO (CONCENETRAÇÃO DE 10^4 CONÍDIOS/mL) PULVERIZADA (50 mL/PLANTA), DE TRÊS ISOLADOS DE <i>Colletotrichum spp.</i> EM RAMOS DO ANO DE CAQUIZEIRO.....	32
TABELA 4-	TABELA 4 - AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum spp.</i> EM RAMOS DO ANO DE CAQUIZEIRO FUYU AOS 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO, CURITIBA-PR.....	33
TABELA 5-	TABELA 5 - AGRESSIVIDADE AVALIADA PELO PERÍODO DE INCUBAÇÃO, AACPD E DIÂMETRO DA LESÃO DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum spp.</i> EM FRUTOS DE CAQUI FUYU, CURITIBA-PR, 2011.....	35
TABELA 6-	CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DE VERSO E REVERSO DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum spp.</i> EM MEIO BATATA DEXTROSE E ÁGAR (BDA), A 25°C.....	37

TABELA 7-	CRESCIMENTO MICELIAL (\emptyset , mm), DE 4 ISOLADO DE <i>Colletotrichum spp.</i> EM NOVE TEMPERATURAS DIFERENTES.....	40
TABELA 8-	INFECÇÃO LATENTE DE <i>Colletotrichum spp.</i> EM FRUTOS DE CAQUI FUYU E KAKIMEL AOS 90, 120 E 150 DIAS APÓS PLENA FLORAÇÃO, CURITIBA-PR.....	45
TABELA 9-	RELAÇÃO ENTRE CONDIÇÕES CLIMÁTICAS, LATÊNCIA E QUEDA DE FRUTOS DE CAQUI KAKIMEL COM E SEM SINTOMAS DE ANTRACNOSE, NOS CICLOS DE 2010/11 E 2011/12, EM DIFERENTES PERÍODO DE AVALIAÇÃO.....	46
TABELA 10-	VARIÁVEIS CLIMÁTICAS: UMIDADE RELATIVA (UR), TEMPERATURA MÉDIA (T. MÉD) E PRECIPITAÇÃO ACUMULADA (PREC), FORNECIDAS PELO SIMEPAR E COLETADAS NA ESTAÇÃO CLIMATOLÓGICA DE PINHAIS-PR, (REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA).....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 CAQUIZEIRO	15
2.2 ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO	17
2.2.1 Patogenicidade de <i>Colletotrichum spp.</i>	18
2.2.2 Caracterização morfológica, fisiológica e molecular de <i>Colletotrichum spp.</i>	19
2.2.3 Infecção latente em fruto verde e em pós colheita	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Colletotrichum spp.</i>	23
3.1.1 Patogenicidade e agressividade dos isolados.....	24
3.1.2 Caracterização cultural e fisiológica dos isolados	26
3.1.3 Caracterização molecular dos isolados	26
3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	27
3.3 DESENVOLVIMENTO DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO CAMPO.....	28
4. RESULTADOS.....	31
4.1 PATOGENICIDADE DE ISOLADOS <i>Colletotrichum spp.</i>	31
4.2 AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum spp.</i> EM RAMOS E FRUTOS.....	33
4.3 CARACTERIZAÇÃO CULTURAL	37
4.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA	39
4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	40
4.6 DESENVOLVIMENTO DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO CAMPO.....	42
4.6.1 Queda de frutos assintomáticos	42

4.6.2 Queda de frutos sintomáticos.....	43
4.6.3 Infecção de <i>Colletotrichum spp.</i> na flor de caquizeiro	44
4.6.4 Infecção latente de <i>Colletotrichum spp.</i> , em frutos verdes de caqui	45
4.6.5 Incidência de antracnose em frutos pós-colheita	45
4.7 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NOS CICLOS DE 2010/11 E 2011/12	47
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	53
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
8 REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O caquizeiro (*Diospyros kaki L.*) foi introduzido no Brasil no fim do século XIX, mas a expansão da cultura só ocorreu a partir de 1920, com a chegada de imigrantes japoneses que trouxeram outras cultivares e o domínio da produção (SATO; ASSUMPÇÃO, 2002).

O caqui é um fruto delicado e degustado basicamente “in natura”, concentrando boas quantidades de vitaminas A, B e C. O teor de açúcar, que varia entre 14 e 18%, supera o da maioria das frutas. Além do consumo como fruta fresca, o caqui pode ser industrializado no preparo de vinagre e caqui-passas. (PIO, 2003)

Os principais produtores mundiais foram China (3.045.801 t), República da Korea (390.611 t), Japão (189.400 t) e Brasil (164.495 t) (FAO, 2010).

A produção nacional de caquis em 2010 foi de 164 495 t, sendo São Paulo o maior produtor com 47,2%, seguido pelo Rio Grande do Sul com 18,1%, Paraná com 14,1%, Rio de Janeiro com 11,5%, Minas Gerais com 6,7% e Santa Catarina com 2,0% (IBGE, 2010).

No estado do Paraná a principal região produtora foi Campina Grande do Sul seguida por Santana do Itararé e Bocaiúva do Sul, com 14,9, 7,74 e 7,10%, respectivamente. A região Metropolitana de Curitiba produz aproximadamente 27,81% do caqui paranaense e 45,59% da produção está distribuída em pequenas propriedades (SEAB-PR, 2010).

O caquizeiro é conhecido pela rusticidade, vigor e produtividade. Todavia a produção entre os anos de 2006 e 2007 apresentou queda de 25% (SEAB-PR, 2010). Essa queda foi refletida pela região metropolitana de Curitiba e principalmente por Campina Grande do Sul, onde a partir de 2006, pomares vêm sendo erradicados com o surgimento de uma “nova” doença, que ocasiona, em muitos casos, danos de 100%. Essa doença vem sendo relatada como antracnose, cujo agente etiológico é *Colletotrichum spp.*

A antracnose, no mundo, é frequentemente atribuída a *Colletotrichum gloeosporioides* e em menor extensão a *Colletotrichum acutatum*. Porém estes resultados foram obtidos com base em identificação morfológica, ou quando utilizados os dados da sequência genética, as comparações foram feitas com nomes indevidamente aplicados. *Colletotrichum gloeosporioides* foi recentemente epitificado,

de modo que as colônias e os dados da sequência estão pela primeira vez disponíveis para comparação, com novas coleções. A sequência genética de 25 isolados de oito frutos tropicais foram comparados com os epítipos *C. gloeosporioides*. Ao contrário do previsto anteriormente, nenhum dos 25 isolados de *Colletotrichum* de frutos tropicais foi *C. gloeosporioides*. As cinco regiões do gene utilizada no estudo identificaram *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. horii*, *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* com diferentes linhagens filogenéticas com apoio estatístico elevado. Características de colônias, conídios e apressórios podem ser usadas para diferenciar um taxon em complexos de espécies, mas não podem separar as espécies dentro de um complexo. (PHOULIVONG *et al.*, 2010).

A antracnose do caquizeiro, causada por *Colletotrichum horii*, é facilmente observada no sul da China, maior produtor mundial da fruta. Os sintomas são geralmente encontrados em ramos novos, infectados antes da lignificação e nos frutos, sendo raros em folhas, porém podem ocorrer no pecíolo, nervura principal e na sépala. Em frutos, ocorre principalmente no período de alongamento para o amadurecimento. Em pomares de alta densidade de plantas e ramos, em ambientes chuvosos e com grande formação de orvalho, a antracnose ocorre com maior severidade (YANG *et al.*, 2009).

O número reduzido de pesquisas em doenças de caquizeiro no Brasil dificulta a compreensão do problema. O conhecimento sobre a antracnose do caquizeiro ajudará na determinação de táticas de manejo, de modo a evitar a erradicação desta cultura tradicional, que cultivada em pequenas propriedades apresenta grande importância econômica e social para a região, pela geração de empregos diretos e indiretos.

Os objetivos deste trabalho foram: a) determinar a patogenicidade e agressividade de isolados de *Colletotrichum spp.*; b) caracterizar isolados do patógeno cultural, fisiológica e molecularmente; c) quantificar incidência da antracnose em campo, em dois ciclos (2010/11 e 2011/12), avaliando-se infecção em flores, em frutos verdes e maduros e em pós-colheita e, d) quantificar queda de frutos desde o início da frutificação até a colheita.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAQUIZEIRO

Pertencente à família *Ebenaceae*, o gênero *Diospyros* agrega predominantemente espécies perenes encontradas em climas subtropicais e tropicais ao redor do mundo. No entanto, um pequeno número de espécies adaptou-se ao clima temperado, originando algumas de hábito decíduo, e dentre elas, a de maior valor comercial é o caquizeiro (*Diospyros kaki* L.). O caquizeiro pode ser considerado a espécie com maior adaptação ao clima tropical se comparada a outras frutíferas de clima temperado, sendo cultivada com sucesso em vários países tropicais e subtropicais (MOWAT; GEORGE; COLLINS, 1995).

No Brasil o fruto de caqui é classificado em três grupos. O primeiro é denominado "Sibugaki" que apresenta os frutos sempre taninosos e com coloração amarelada, com sementes ou não, sendo as principais cultivares: Taubaté, Pomelo, Hachiya e Coração de boi. O segundo grupo é denominado "Amagaki", compreendendo frutos de polpa sempre não taninosa e de cor amarelada, com sementes ou não, chamados de doces ou duros, tendo como principais cultivares: Fuyu, Jiro, Hanagoshō e Fuyuhana. O terceiro grupo é denominado "Variável" e inclui os frutos taninosos de polpa amarelada quando sem sementes e não taninosa, parcial ou totalmente, quando com semente. Com sementes numerosas a polpa é escura, popularmente chamado de "chocolate". Tem como representantes: Ramaforte, Giombo e Kioto (MARTINS; PEREIRA, 1989).

Apesar do seu crescimento lento, o caquizeiro atinge portes que variam de três a quinze metros. O tronco, quando cultivado em pomares, é curto e tortuoso e a copa profusamente ramificada. O caquizeiro entra em produção comercial a partir do quarto ano sendo que a produtividade aumenta progressivamente até os 15 anos, quando se estabiliza (SIMÃO, 1998).

As flores de coloração branco-creme surgem junto à axila das folhas dos ramos novos, logo após a brotação, que sucede o período de repouso hibernar. O caquizeiro pode apresentar três tipos de flores: masculina, feminina e hermafrodita, podendo encontrar as três formas numa mesma planta (MARTINS; PEREIRA, 1989).

Segundo Simão (1998), as flores masculinas são facilmente identificadas pois são menores (em torno de 1,3 cm, com a maioria de 0,8 a 1,8 cm de comprimento) e estão dispostas em cachos de três flores curto-pecioladas ou subsésseis no mesmo pedúnculo, possui estames normais, em número par de 14 a 24 na base da corola e com ovário atrofiado. Já as flores femininas aparecem isoladas nas axilas dos ramos, são maiores que as masculinas, com 1,5 a 2,5 cm de comprimento e 0,5 a 1 cm de largura. Há de 8 a 16 estaminóides quando 8 livres e 16 quando unidos aos pares, inseridos na base do tubo da corola. Nas flores femininas, o cálice, a corola, e o ovário são bastante desenvolvidos e os estames atrofiados. As flores hermafroditas, que são raras, surgem quase sempre associadas às flores masculinas. A maioria das cultivares tem tendência a produzir frutos partenocárpico, portanto sem a necessidade de estímulo a polinização.

De acordo com Mowat e George (1994) o crescimento do fruto do caquizeiro exibe uma curva do tipo sigmoidal duplo, estando subdivididos em dois estágios de intensa atividade, os estágios I e III, intercalada por um estágio de pouca atividade, o estágio II. O estágio I está associado aos processos de divisão e diferenciação celular com duração média de 60 a 100 dias. O significado do estágio II, cuja duração varia de 20 a 40 dias é ainda incerto e parece refletir fatores de influência genética, fisiológica e ambiental, responsáveis pela finalização do estágio I e início do estágio III. Durante o estágio III, cuja duração varia de 40 a 50 dias, ocorrem os processos de alongação e maturação celular.

Gin Razzouk (2007) avaliou o número de dias após a poda e os estádios fenológicos da cultivar Fuyu no município de Selviria-MS. O estágio gema dormente ocorreu entre 27 a 33 dias após a poda. No início de agosto, 35 a 47 dias após a poda, o estágio era gema inchada. Na primeira quinzena de agosto de 42 a 68 dias após a poda, ocorreu a brotação. O florescimento ocorreu entre o final de outubro e o começo de novembro, de 103 a 124 dias, após a poda. A frutificação foi no final de novembro e início de dezembro de 145 a 166 dias após a poda, sendo que a colheita ocorreu no final de fevereiro aos 214 dias após a poda.

Existe um pico de queda natural dos frutos, que ocorre nas cultivares Rubi, Taubaté, Toote e Fuyu aos 42 dias após o florescimento, ou seja, na primeira quinzena de dezembro. Para as cultivares Pomelo, Rama Forte, Giombo e Suruga este pico é mais tardio, dos 63 aos 98 dias, do início de dezembro ao início de janeiro. A cultivar Jiro apresenta o pico de queda mais precoce, apenas uma semana após o

florescimento. Para Jiro e Fuyu a queda de frutos acentuada pode ser explicada pela falta de polinização (GIN RAZZOUK, 2007).

Corsato, Scarpate Filho e Verdial (2005) observaram um período de abortamento natural de frutos imaturos para a cultivar Rama Forte. Este se inicia quatro dias após o início do florescimento, perdurando por toda a primavera. A partir dessa data ocorrem dois picos distintos na quantidade de flores/frutos abortados. O primeiro aos 21 dias após o início do florescimento, onde caem, aproximadamente, 25 % dos frutos. O segundo pico ocorre 48 dias após o início do florescimento, onde 39 % dos frutos caem, restando ao final dos dois picos de queda aproximadamente 45 % da frutificação inicial.

2.2 ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO

A antracnose do caquizeiro é comumente observada no sul da China, maior produtor mundial da fruta. Com o rápido avanço da indústria de caqui, e consequente aumento da área plantada, esta se tornou endêmica em todas as regiões de plantio. A suscetibilidade a essa doença está correlacionada a diferentes cultivares. As cultivares mais susceptíveis são facilmente infectadas, resultando em prejuízo significativo para o vigor das árvores. Os sintomas são geralmente encontrados em ramos novos, infectados antes da lignificação e nos frutos, sendo raros em folhas, porém podem ocorrer no pecíolo, nervura principal e sépala. Em frutos, ocorre principalmente no período de alongamento para o amadurecimento. Nos pomares de alta densidade de plantas e ramos, em ambientes chuvosos e com grande formação de orvalho, a antracnose ocorre com maior severidade (YANG *et al.*, 2009).

Segundo Xie *et al* (2010) o inóculo inicial tem como origem ramos vivos com lesão de antracnose, os conídios são dispersos pela chuva e pelo vento infectando ramos novos, a curtas distâncias, sendo a temperatura ideal para infecção ao redor de 25°C.

A antracnose apresenta-se como uma doença destrutiva e em casos mais severos, quando ocorre em ramos, provoca redução no crescimento das árvores podendo levá-las a morte em dois ou três anos (XIE *et al.*, 2010)

Os frutos infectados, apresentam manchas deprimidas, necróticas com 1 cm de diâmetro ou mais, sendo estes impróprios para a comercialização. Uma massa gelatinosa com conídios, de coloração rósea, é formada em zonas concêntricas na parte mais velha da lesão, estes podem ser disseminados pelo vento, água ou insetos (DA SILVA, 1940).

Em ramos, o sintoma se assemelha aos frutos, apresenta lesões deprimidas que em condições favoráveis podem coalescer aumentando em tamanho, até que o galho esteja todo infectado levando-o a morte. As lesões podem tornar-se dormentes em condições desfavoráveis, porém o fungo continua a se estender para o xilema resultando em colapso com fissuras longitudinais, formando cancrios. Quando ocorre em pecíolo as lesões raramente se fundem e a folha pode continuar a se desenvolver permanecendo verde por um longo período, mas pode ser facilmente arrancada pelo vento (XIE *et al.*, 2010).

2.2.1 Patogenicidade de *Colletotrichum spp.*

Os testes de patogenicidade são realizados para confirmar se um patógeno é realmente o agente causal da doença em estudo. Isolados de *Colletotrichum horii* inoculados, com suspensão de conídios, em ramos e folhas de caquizeiro apresentaram virulência, tanto com ferimento quanto sem ferimento. O período de incubação foi de 3 dias, sendo que após 5 dias as lesões já apresentavam-se graves e com esporulação. O tamanho das lesões variou muito em função da idade dos galhos. Tamanho médio de lesão com e sem ferimento nos galhos de caqui foi 3,75 cm ($\pm 0,94$) e 3,68 cm ($\pm 1,73$), respectivamente, e 2,07 cm ($\pm 0,67$) e 2,26 cm ($\pm 0,72$) nas nervuras das folhas. Um grande número de massas amarelo-rosa de conídios foi produzido nas partes centrais das lesões. Sete dias após a inoculação, as lesões haviam se estendido pelo galho inteiro ou nervura principal (XIE *et al.*, 2010).

Williamson e Sutton (2010) em Windsor, Carolina do Norte, observaram frutos de caqui em pós-colheita, apresentando lesões escuras que, após isolamento foram identificadas como antracnose, causada por *Colletotrichum acutatum*. Teste de patogenicidade foi realizado, onde três frutos foram inoculados por tratamento e os

discos foram colocados em quatro locais em cada fruto. Os frutos foram colocados em câmara úmida e incubados a 25°C. Após 3 dias, pequenas lesões escuras foram observados nos frutos inoculados com isolado de *C. acutatum*. Dez dias após a inoculação, observou-se nas lesões escuras a formação de acérvulos com massa de conídios com coloração salmão.

A patogenicidade de *C. gloeosporioides* foi testada em frutos de manga, mamão (*Carica papaya*), goiaba (*Psidium guajava*) e maracujá (*Passiflora* sp.). A inoculação do *C. gloeosporioides* foi feita de forma direta, fazendo-se um ferimento no fruto e colocando-se, em seguida, um disco de micélio. Todos os isolados apresentaram patogenicidade em todas as espécies frutíferas consideradas. A goiaba foi o hospedeiro que apresentou menor suscetibilidade aos isolados de *C. gloeosporioides*. As mangas (*Mangifera indica*) 'Tommy', 'Atkins' e 'Rosa' e o mamão apresentam o maior crescimento das lesões, portanto maior suscetibilidade (SILVA *et al.*, 2006).

Em teste de patogenicidade de *Colletotrichum* spp. com frutos de maracujá, a agressividade foi medida através do diâmetro das lesões que variaram de 83,6 mm (isolado mais agressivo) a 42,6 mm (isolado menos agressivo) (ALMEIDA; COELHO, 2007). O teste de patogenicidade em frutos de mamão com isolados de *Colletotrichum* spp. demonstrou que isolados do fruto de mamão e também do pecíolo foram patogênicos em frutos, não havendo especificidade entre as partes vegetais (ANDRADE *et al.*, 2007).

2.2.2 Caracterização morfológica, fisiológica e molecular de *Colletotrichum* spp.

Em caqui, Xie *et al.* (2010) relataram a ocorrência de *Colletotrichum horii* que apresentou colônias aveludadas em BDA (Batata, Dextrose e Ágar), cinza escuro para cinza, com grande número de conídios laranja-amarelados. Fundo da placa cinza escuro a marrom escuro, com zona concêntrica. Os conidióforos com dimensões 11,5-35 × 3-4,5 µm, produzidos em acérvulos, fasciculados em linha reta, 1-3 septos, cinza escuro na base, reduzido a uma única célula hialina conidiogênica sobre o hospedeiro natural. Células conidiogênicas 9,5-15 × 3-4,5 µm, cilíndricas, lisa,

com borda escura. Conídios $17 - 20,5 \times 6,5 - 5,5 \mu\text{m}$, formados em massas laranja-amareladas, holoblásticos, cilíndricos, retos ou ligeiramente curvos, não septados, lisos, ápice obtuso em ambas as extremidades, com uma protuberância baixa na base tipo hilo. Sob microscopia eletrônica de varredura observaram ápice obtuso, conídios de base truncada, com um hilo truncado e oco.

Colletotrichum acutatum de caqui, em BDA, apresentou micélio aéreo cinza, e os lados inversos das placas de seis isolados foram marrom e um bege. Massas de conídios de cor salmão foram formadas no centro das colônias. Conídios hialinos, unicelulares, elípticos com uma ou ambas as extremidades pontiagudas, e medindo $8,1-16,3 \times 3,1-5 \mu\text{m}$ (WILLIAMSON; SUTTON, 2010).

Para *C. gloeosporioides* em maracujá as colônias desenvolveram micélio de cor branca, cinza claro, cinza escuro, oliva escuro e rosa (ALMEIDA; COELHO, 2007).

Andrade *et al.* (2007) dividiram 33 isolados de *Colletotrichum* spp. de mamão em grupos de acordo com as características de coloração da colônia, sendo Grupo A- salmão, B- cinza escuro, C- cinza escuro no centro e branco ao redor, D- cinza claro no centro com bordas brancas, E- branca, F- cinza claro no centro com abundante esporulação no centro, G- negra, mostrando a grande variabilidade que pode haver nas características culturais do gênero *Colletotrichum*.

Em jiló (*Solanum gilo*), isolados de *C. gloeosporioides*, demonstraram melhor índice de crescimento micelial entre 25 e 28°C e *C. acutatum* apresentou melhor índice próximo a 28°C (TOZZE JUNIOR; MELLO; MASSOLA JUNIOR, 2006). Em caqui, a taxa de crescimento média diária a 25°C (temperatura ideal) de *Colletotrichum horii* foi de $12,8 \pm 0,8 \text{ mm por dia}$ (XIE *et al.*, 2010). Em cafeeiro (*Coffea arabica*), a temperatura ótima, *in vitro*, para crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* spp., no estado de Minas Gerais, ficou entre 22 e 28°C (DIAS *et al.*, 2004).

A antracnose, em frutíferas, é frequentemente atribuída a *C. gloeosporioides* e em menor extensão a *C. acutatum*. Porém estes resultados foram obtidos com base em identificação morfológica, ou, quando utilizados dados da sequência genética as comparações foram feitas com nomes indevidamente aplicados. *C. gloeosporioides* foi recentemente epitificado, de modo que as colônias e os dados da sequência estão pela primeira vez disponíveis para comparação com novas coleções. A sequência genética de 25 isolados de oito frutos tropicais foi comparada com os epitipo *C. gloeosporioides*. Ao contrário do previsto anteriormente, nenhum dos 25 isolados de

Colletotrichum de frutas tropicais foi *C. gloeosporioides*. As cinco regiões do gene utilizadas neste estudo identificaram *Colletotrichum asianum*, *C. fructicola*, *C. horii*, *C. kahawae* e *C. gloeosporioides* no complexo dos "*gloeosporioides*" como diferentes linhagens filogenéticas. Características de colônias, conídios e apressórios podem ser usados para diferenciar um taxon em complexos de espécies, mas não podem separar as espécies dentro de um complexo (PHOULIVONG *et al.*, 2010).

Em caqui, o agente causal da antracnose era designado por *Gloeosporium kaki Horii*. Um neotipo foi determinado para este patógeno sendo agora chamado de *Colletotrichum horii*. Análises moleculares e morfológicas determinaram que esta espécie é um grupo distinto do Complexo *Colletotrichum gloeosporioides* lato sensu (WEIR; JOHNSTON, 2010).

Para Xie *et al.* (2010) parcial actina (ACT), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), glutamina sintetase (GS), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH) e os genes completos rDNAITS (ITS) foram as cinco regiões amplificadas por PCR para determinação da espécie de *Colletotrichum* do caqui, concluindo que a espécie que causa a antracnose em caqui é *C. horii* e está intimamente relacionada com *C. kahawae* porém *C. horii* apresenta conídios muito mais largos.

Sun *et al.* (2012) construíram a primeira biblioteca de cosmídeo, para clonagem de genes relacionados a patogênese de *C. horii* e para analisar as características genéticas da espécie.

2.2.3 Infecção latente em fruto verde e em pós colheita

Xie *et al.* (2010) observaram que em situações desfavoráveis *C. horii* poderá permanecer dormiente em ramos de caqui, porém o fungo continua a se desenvolver dentro do xilema, resultando em colapso com ruptura longitudinal. Em frutos de caqui, o patógeno pode surgir em condições de prateleira ou em packing houses, resultando em podridão do fruto na pós-colheita.

Palou *et al.* (2009) avaliaram, por dois anos seguidos, os patógenos que surgiram em dois pomares da Espanha em pós-colheita. Os principais agentes causais de infecções latentes e doenças em fermentos foram *Alternaria alternata* e

Penicillium spp. Os mesmos patógenos e também *Botrytis cinerea* e *Cladosporium* spp. foram os fungos frequentemente isolados de frutos armazenados a frio.

Segundo Sivanathan e Adikaram (1989) *C. gloeosporioides* possui enzimas com potencial suficiente para invadir paredes celulares de frutos verdes de abacate e os tecidos destes frutos não têm um mecanismo para inativar tais enzimas, podendo assim infectar fruto verdes e permanecer latente até condições favoráveis.

Em pessegueiro, frutos verdes foram inoculados com suspensão de conídios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* aproximadamente 2 semanas antes endurecimento do caroço e em intervalos regulares durante todo o período de crescimento até a colheita. Estes permaneceram assintomáticos ou desenvolveram pequenas lesões necróticas estáveis. Até 100% de frutos inoculados com *C. gloeosporioides* desenvolveram sintomas de antracnose quando maduro. Já para *C. acutatum* o sintoma ocorreu em até 83% dos frutos quando maduros. O fruto de pêssago pode ser infectado com *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides* no início do desenvolvimento e manter-se assintomático até a colheita (ZAITLIN; ZEHR; DEAN, 2000).

Colletotrichum acutatum foi detectado por PCR, em morangueiro assintomático. Os resultados positivos de PCR foram obtidos a partir de frutos maduros e verdes, pecíolos e partes da corola, demonstrando a capacidade do patógeno em permanecer latente (PARIKKA; LEMMETTY, 2004).

Garibaldi *et al.* (2010) relataram pela primeira vez, na Itália, a incidência de *Phacidiopycnis washingtonensis* em frutos de caqui em pós-colheita, apresentando sintoma de lesão firme, de forma elíptica, castanho claro ao escuro verde-oliva.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum spp.*

Foram coletados folhas, frutos e ramos sintomáticos de caquizeiro das cultivares Fuyu e Kakimel em quatro pomares de cultivo orgânico e um de cultivo convencional. Esses pomares estão localizados nos municípios de Bocaiúva do Sul, Quatro Barras, Lapa (orgânicos) e Campina Grande do Sul (um orgânico e um convencional), que fazem parte da região metropolitana de Curitiba, com coordenadas (S 25°12'01,15" / 49° 07'53,61"), (S 25°20'57,01" / 49° 00'28,04"), (S 25°45'18,72" / 49°56'21,60") (S 25°14'36,7" / W 48°58'07,9") e (S 25°22'32,8" / W 49°16'23,3") respectivamente (Datum SAD 69). O Clima é subtropical de altitude (Cfb) segundo classificação climática de Koppen.

No laboratório, ramos e frutos coletados foram colocados em câmara úmida por 48 horas. Após esse período, estruturas fúngicas do patógeno foram retiradas e depositadas em placa de petri, contendo meio batata-dextrose- ágar (BDA). As placas foram mantidas em câmaras de crescimento a 25 \pm 2°C e com fotoperíodo de 12 horas, durante 15 dias. Decorrido este tempo, observou-se a germinação dos conídios e procedeu-se o isolamento monospórico. Foi adicionado em cada placa de petri com as colônias puras do fungo, 5 mL de água destilada esterilizada, com a finalidade de se obter uma suspensão de conídios, desta suspensão foi pipetado 1mL contendo aproximadamente 10² conídios e colocado em placa de petri contendo ágar-água. As placas foram mantidas em BOD (Eletrolab - mod. EL 202) a 25 \pm 2°C por aproximadamente 15 horas. Em microscópio ótico observou-se a germinação dos conídios, e com auxílio de alça bacteriológica coletou-se um único conídio germinado, que foi transferido para placa de petri contendo meio BDA. Todos os isolados da coleção foram armazenados pelo método de Castellani, onde discos de micélio são depositados em frascos de vidro com água destilada esterilizada e mantidos em temperatura de aproximadamente 6°C, no Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças, (LEMID), localizado no setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR)

3.1.1 Patogenicidade e agressividade dos isolados.

Para teste de patogenicidade em frutos, coletaram-se frutos sadios, em ponto de colheita, da cultivar Fuyu, trazidos de pomar orgânico da região de Campina Grande do Sul e lavados em água corrente. Foram realizados 3 pontos de inoculação em cada fruto. Considerou-se cada terço de fruto inoculado como uma parcela experimental, sendo aleatória a sua distribuição entre os frutos. Foram seis pontos de inoculação com ferimento para todos os isolados, com exceção do Co 25-CGS, Co 42-CGS e Co 43-CGS (total de 13 isolados). Utilizou-se 26 frutos, totalizando 78 pontos de inoculação. O ferimento foi realizado com furador cilíndrico (\varnothing 3,0 mm) para encaixe do disco de micélio.

Os isolados foram inoculados com discos de micélio de colônia monospórica (\varnothing 3,0 mm), com 15 dias de idade. Estes foram cuidadosamente depositados sobre os frutos que foram acondicionados em caixas plásticas com papel filtro umedecido, sob fotoperíodo de 12 h, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade entre 90 e 100%.

Todos foram reisolados indiretamente, retirando pedaços (3 x 3 mm) da área de transição entre tecido sadio e tecido lesionado. Os pedaços foram depositados em placas de petri com meio BDA e colocadas em câmaras de crescimento tipo BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas até o crescimento das colônias.

Os isolados Co 25-CGS, Co 42-CGS e Co 43-CGS foram utilizados apenas para teste de patogenicidade, com suspensão de conídios, não participando dos testes de agressividade. A patogenicidade foi realizada em plantas de caqui, cultivadas em vasos (12L) e podadas para emissão de ramos novos, aproximadamente 30 dias antes da inoculação. Para cada isolado foram utilizadas duas mudas de caqui, sendo que, cada muda recebeu, de maneira aleatória, 6 ferimentos de 3 mm de comprimento, realizados com agulha histológica esterilizada.

Em cada placa de petri das colônias, foi depositado 5 mL de água destilada esterilizada, esse volume de suspensão contendo conídios foi retirado e diluído para 100 mL contendo 14^4 conídios por mL. A suspensão foi pulverizada em cada muda, 50 mL. muda⁻¹. Todos os ramos foram avaliados quanto à incidência da doença durante 10 dias.

Para o teste de agressividade em planta de caquizeiro foram selecionadas oito plantas, da cultivar Fuyu, de 3 anos de idade, cultivadas em vasos (12 L) e mantidas em casa de vegetação. Para cada isolado (total de 13) foram escolhidos, de forma aleatória, três ramos do ano, e nesses ramos cada isolado foi inoculado em duas posições, uma a 4 cm da inserção do ramo principal (com ferimento) e outra a 10 cm (sem ferimento). Os ferimentos foram realizados com agulha histológica tendo 3 mm de comprimento e 1 mm de profundidade. No total foram utilizados 39 ramos (3 ramos por isolado).

Um disco de micélio de colônia monospórica (\varnothing 3,0 mm), com 15 dias de idade, de cada isolado foi cuidadosamente depositado sobre o ramo, nas duas posições, e fixado com parafilme com a parte do micélio voltada para o ramo. As mudas permaneceram em sala de crescimento sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura entre 21 e 25°C. Após 14 dias as lesões foram medidas longitudinalmente e anotaram-se os ramos que sofreram anelamento.

Para o teste de agressividade em frutos de caqui, coletaram-se frutos sadios, em ponto de colheita, da cultivar Fuyu, trazidos de pomar orgânico da região de Campina Grande do Sul e lavados em água corrente. Foram realizados 3 pontos de inoculação por fruto. Considerou-se cada terço de fruto inoculado como uma parcela experimental, sendo aleatória a sua distribuição entre os frutos. Foram seis pontos de inoculação com ferimento e seis sem ferimento para cada isolado (total de 13 isolados). Totalizando 52 frutos e 156 pontos de inoculação. O ferimento foi realizado com furador cilíndrico (\varnothing 3,0 mm) para encaixe do disco de micélio. Discos de micélio de colônia monospórica (\varnothing 3,0 mm), com 15 dias de idade, de cada isolado foram cuidadosamente depositados sobre os frutos que foram acondicionados em caixas plásticas com papel filtro umedecido, sob fotoperíodo de 12 h, aproximadamente 25°C e umidade entre 90 e 100%. Para determinação da agressividade a avaliação ocorreu no 12º dia medindo-se as lesões em dois sentidos diametralmente opostos.

O período de incubação para cada isolado foi considerado o período compreendido entre a inoculação e o aparecimento de sintomas em 50% dos pontos inoculados.

3.1.2 Caracterização cultural e fisiológica dos isolados

Para a caracterização cultural dos isolados, discos de micélio (\varnothing 3,0 mm) de cada isolado foram extraídos de culturas com 20 dias crescidas em BDA e transferidos para placas de petri, de 6 cm de diâmetro contendo meio BDA, tendo cada isolado três repetições. Após 15 dias observou-se a coloração do verso e reverso das colônias e o aspecto do micélio aéreo.

Para caracterização fisiológica, discos de micélio (\varnothing 3,0 mm) de 4 isolados foram extraídos de culturas com 20 dias crescidas em BDA e transferidos para placas de petri de 6 cm de diâmetro contendo meio BDA, tendo cada isolado três repetições. O experimento foi realizado em três etapas sendo que na primeira foram testadas as temperaturas 6, 11, 21 e 31°C, na segunda 15, 18 e 25°C e na terceira 20 e 30°C. As placas foram mantidas em BODs sob ausência de fotoperíodo. O diâmetro do crescimento micelial foi medido em duas direções diametralmente opostas, no quinto dia após a repicagem.

3.1.3 Caracterização molecular dos isolados

O DNA genômico dos isolados foi obtido com Kit de extração UltraClean™ Microbial DNA Kit (MO Bio, Carlsbad, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para identificação molecular dos isolados foi realizado o sequenciamento da Região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA e parte do gene de fator de alongação 1- α (EF1-a). A reação de amplificação foi realizada com os *primers* V9G (5'TTACGTCCCTGCCCTTTGTA3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (WHITE *et al.*, 1990), que são universais para fungos e permitem amplificar a região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal. As condições da reação foram realizadas seguindo protocolo de White *et al.* (1990). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72°C. A purificação do produto de PCR foi realizada com acetato de amônio e etanol PA e o

pellet resultante foi ressuspendido em 15 µL de água ultra-pura esterilizada. Para reação de sequenciamento foi utilizado o Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing para MegaBace (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), seguindo as instruções do fabricante. A amplificação parcial do gene de fator de alongação 1-α (EF1-α) foi realizada com os primers EF1-728F (5'CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG3') e EF-2 (5'GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT3') (CARBONE; KOHN 1999), com as mesmas condições descritas anteriormente. A qualidade dos produtos de PCR foi verificada em gel de agarose. O produto final da amplificação foi purificado com Sephadex (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) e submetida à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE (Amersham Biosciences®).

O alinhamento das sequências obtidas foi realizado com auxílio do programa CLUSTAL-W versão 1.7 (THOMPSON *et al.*, 1994). Foi realizada posterior inspeção visual através do programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999). As sequências obtidas foram também comparadas com outras sequências existentes no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1997). Para análise das sequências obtidas no presente trabalho, foi utilizado o programa Megablast, comparando sequências de nucleotídeos altamente similares do banco de dados de seqüências de nucleotídeos do GeneBank. A análise filogenética foi realizada com auxílio do programa PAUP* 4.0 b10 (SWOFFORD, 1998) e a análise de inferência Bayesiana foi conduzida utilizando o programa *MrBayes* (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001).

3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Para o teste de patogenicidade e agressividade, o delineamento foi inteiramente casualizado com 3 repetições para plantas de caquizeiro e 6 repetições para frutos de caqui. O software R foi utilizado para análise dos dados. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% , sendo que os dados com fermento foram transformados em \sqrt{x} e sem fermento em $\sqrt{x+1}$.

Para caracterização fisiológica o delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e os

isolados foram comparados por temperatura pelo teste Scott-Knott ao nível de 5%. Utilizou-se software R para modelagem não linear da beta generalizada, $(y = b_1 (T - b_2)^{b_4} (b_3 - T)^{b_5})$, em que b_2 é o parâmetro estimador da temperatura mínima; b_4 é o parâmetro estimador da temperatura máxima; b_1 , b_3 e b_5 são os parâmetros da equação; T é a variável independente, nesse caso a temperatura; e y , a variável dependente nesse caso o crescimento micelial.

Para o teste de agressividade de isolados de *Colletotrichum spp.* em frutos os dados do diâmetro das lesões, nas diferentes datas de avaliações foram integralizados no tempo e transformados em AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença). Para o cálculo da AACPD da agressividade utilizou-se a equação:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1})/2] (t_{i+1} - t_i)$$

onde X é a Agressividade média da doença por isolado, $X_1 = x(t_1)$, n é o número de avaliações, e $(t_{i+1} - t_i)$ é o intervalo entre duas avaliações consecutivas (SHANER; FINNEY, 1977).

Para verificar a interferência do clima sobre a doença, (dados climáticos fornecidos pelo Simepar) foi realizada a correlação entre as variáveis climáticas: temperatura média, umidade relativa média e precipitação acumulada dos dez dias anteriores a cada período avaliado e ainda número de dias após a floração com o número de frutos caídos sem sintoma e número de frutos caídos com sintoma, sendo utilizado o software R.

3.3 DESENVOLVIMENTO DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO CAMPO

O experimento foi conduzido, durante os ciclos de 2010/11 e 2011/12, em dois pomares localizados no município de Campina Grande do Sul região metropolitana de Curitiba-PR, o clima na região é subtropical de altitude (Cfb) segundo classificação climática de Koppen. O primeiro pomar é da cultivar Fuyu, cultivo orgânico, aproximadamente 3 ha, espaçamento 6 X 5, condução em vaso. O segundo, da cultivar Kakimel, cultivo convencional, aproximadamente 3,5 ha e espaçamento 6 X 5 m entre linhas e plantas, condução em vaso. Coordenadas (S 25°22'32,8" / W

49°16'23,3"), 924 m de altitude e (S 25°14'36,7" / W 48°58'07,9"), 815 m de altitude (Datum SAD 69) respectivamente.

O pomar da cultivar Fuyu, 10 anos (orgânico), está localizado em relevo aproximadamente plano, com ausência de adubação química e ausência de poda das árvores. Tem como único tratamento fitossanitário a aplicação no inverno com calda sulfocálcica a 8% (Sulfocal).

O pomar da cultivar Kakimel, 25 anos, apresenta declividade de aproximadamente 20%, adubação com 300 g de NPK 10-10-10, no início da brotação, realiza poda para abertura da copa da árvores no inverno e poda verde nos meses de novembro e dezembro. Tratamento invernal com calda sulfocálcica a 8% e tratamentos fitossanitários durante o ciclo (Tabela 1).

TABELA 1 - TRATAMENTOS FITOSSANITÁRIOS REALIZADOS NO POMAR DA CULTIVAR KAKIMEL NOS CICLOS DE 2010/11 E 2011/12.

Tratamento fitossanitário					
2010/11			2011/12		
Data	ingrediente ativo	Dose* g/100L	Data	ingrediente ativo	Dose g/100L
12/set	Mancozeb ¹	200	05/set	Mancozeb ¹	200
20/out	Tiofanato Metílico ²	70	07/out	Tiofanato Metílico + Clorotalonil ⁶	200
27/nov	Difenoconazol ³	17	09/nov	Difenoconazol ³	17
04/jan	Metiram + Piroxicam ⁴	250	19/dez	Metiram + Piroxicam ⁴	250
28/fev	Tebuconazol + trifloxistrobina ⁵	60	30/jan	Tebuconazol + trifloxistrobina ⁵	60
17/mar	Tiofanato Metílico ²	70	01/mar	Tiofanato Metílico + Clorotalonil ⁶	200

* Dose do produto comercial. ¹ - Manzate 800 PM; ² - Cercobim 700 PM; ³ - Score; ⁴ - Cabrio Top; ⁵ - Nativo; ⁶ - Cerconil WP.

Em cada pomar foram selecionadas, aleatoriamente, 10 plantas, evitando-se as da bordadura. Nestas plantas foi avaliada a incidência (presença de sintomas) da doença desde a floração até a colheita. Em campo, foi avaliada a incidência de antracnose em ramos, folhas e frutos. Em laboratório foi avaliado incidência em flor, latência de *Colletotrichum* sp. em frutos verdes e incidência de antracnose nos frutos em pós-colheita.

Nas 10 plantas selecionadas foram marcados, com fitas coloridas 10 ramos do ano distribuídos aleatoriamente ao redor da copa de cada planta. Nestes foi avaliada, quinzenalmente, a incidência de antracnose em folhas, frutos e no ramo. Para quantificação da queda de frutos sem sintoma, foi contado o número de frutos

em cada ramo marcado, em cada data de avaliação, possibilitando uma estimativa do número de frutos abortados naturalmente, e período do ciclo em que este fato ocorreu. Além disso, para quantificação dos danos causados pela antracnose em cada planta marcada, todos os frutos, caídos com sintomas da doença, foram contados quinzenalmente, até o dia da colheita. Na colheita, todos os frutos foram quantificados para determinação da produção total de cada planta.

Para avaliação da incidência de antracnose na floração foram coletadas 100 flores, de forma aleatória, nas 10 plantas marcadas em cada pomar, no dia 25/10/2011 (final da floração). Essas flores foram acondicionadas em caixas plásticas tipo gerbox (11 X 11 X 3,5 cm) com papel filtro umedecido em água destilada esterilizada, mantidas em câmara de crescimento a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas. Foi avaliada a incidência de 3 a 7 dias, sendo considerada como positiva a presença de estruturas de *Colletotrichum* sp. em qualquer parte da flor.

Para determinação de *Colletotrichum* sp. latente foram coletadas amostras aleatórias de 50 frutos verdes aos 90, 120 e 150 dias após plena floração, nas 10 plantas marcadas em cada pomar. Seguindo a metodologia "over night freezing", os frutos foram desinfestados em 10 L de solução com 160 ml de hipoclorito (400 ppm) + 160 mL de etanol + 0,5 mL de tween-20, por 4 minutos. Depois foram colocados em saco plástico e acondicionados em freezer a -15°C por 15 horas. Após este período, foram depositados em caixas plásticas com papel filtro umedecido e colocados sob fotoperíodo 12 horas e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Avaliou-se por 7 dias a presença de *Colletotrichum* spp. em qualquer parte do fruto (LUO; MICHAILIDES, 2001).

Para avaliação de incidência de antracnose em pós-colheita coletou-se 20 frutos, em ponto de colheita, de cada uma das 10 árvores em cada pomar. Destes, 10 frutos foram desinfestados, com a mesma solução utilizada na metodologia descrita anteriormente e os outros 10 não foram desinfestados. Todos foram acondicionados em caixas plásticas com papel filtro umedecido e permaneceram em prateleiras com temperatura aproximada de 25°C e fotoperíodo de 12 h. Os frutos foram avaliados quanto a presença de sinais do patógeno no 9, 13 e 18º dia após a colheita.

4. RESULTADOS

Foram obtidos 17 isolados de *Colletotrichum spp.*, cinco de ramo, onze de fruto e um de folha originários da região metropolitana de Curitiba entre os anos de 2009 a 2011, sendo 70% do município de Campina Grande do Sul, principal região produtora do estado do Paraná (TABELA 2).

TABELA 2 - ISOLADOS DE *Colletotrichum spp.* DE CAQUIZEIRO PROVENIENTES DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA-PR.

Isolado	Cultivar	Parte Vegetal	Procedência	Ano
Co 11-BS	Caqui Fuyu	Fruto	Bocaiúva do Sul	2009
Co 13-BS	Caqui Fuyu	Ramo	Bocaiúva do Sul	2010
Co 14-QB	Caqui Fuyu	Ramo	Quatro Barras	2010
Co 07-LP	Caqui Fuyu	Ramo	Lapa	2011
Co 18-LP	Caqui Fuyu	Fruto	Lapa	2011
Co 10-CGS	Caqui Fuyu	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 02-CGS	Caqui Fuyu	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 03-CGS	Caqui Fuyu	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 04-CGS	Caqui Fuyu	Ramo	Campina Grande do Sul	2011
Co 15-CGS	Caqui Fuyu	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 16-CGS	Caqui Fuyu	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 25-CGS	Caqui Fuyu	Ramo	Campina Grande do Sul	2011
Co 42-CGS	Caqui Fuyu	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 43-CGS	Caqui Fuyu	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 09-CGS	Caqui Fuyu	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 17-CGS	Caqui Kakimel	Fruto	Campina Grande do Sul	2011
Co 06-CGS	Caqui Kakimel	Folha	Campina Grande do Sul	2011

4.1 PATOGENICIDADE DE ISOLADOS *Colletotrichum sp.*

No teste de patogenicidade dos 14 isolados de *Colletotrichum spp.* onde foram utilizados discos de micélio em frutos com ferimento, todos os isolados foram patogênicos, e foram reisolados em meio BDA das lesões resultantes da inoculação.

Em teste de patogenicidade realizado com suspensão 10^4 conídios.mL⁻¹, de três isolados de *Colletotrichum spp.*, Co 25-CGS, Co 42-CGS e Co 43-CGS, em ramos do ano, foi verificado que todos foram patogênicos e apresentaram período de

incubação de 3 dias. Dois isolados causaram a morte de aproximadamente 30% dos ramos inoculados após 10 dias (TABELA 3). Foi observado que não ocorreu infecção nos ferimentos realizados nos ramos. Não houve infecção em ramos de um ano ou de maior idade, porém após 20 dias da inoculação as lesões que ocorreram próximas a base do ramo do ano cresceram em direção ao ramo de um ano causando sintomas também nestes. As lesões nas folhas iniciaram-se nas nervuras, e cresceram de forma circular ao redor desta (FIGURA 1).

TABELA 3 - AVALIAÇÃO DE TESTE DE PATOGENICIDADE, COM SUSPENSÃO DO PATÓGENO (CONCENTRAÇÃO DE 10^4 CONÍDIOS/mL) PULVERIZADA (50 mL/PLANTA), DE TRÊS ISOLADOS DE *Colletotrichum spp.* EM RAMOS DO ANO DE CAQUIZEIRO.

Isolados	Período de incubação (dias)	Incidência em ramos após 10 dias da inoculação (%)	AACPI	Ramos mortos após 10 dias da inoculação (%)
Co 25-CGS	3	57,8	363	0
Co 42-CGS	3	87,5	606	31,2
Co 43-CGS	3	84,6	630	30,8

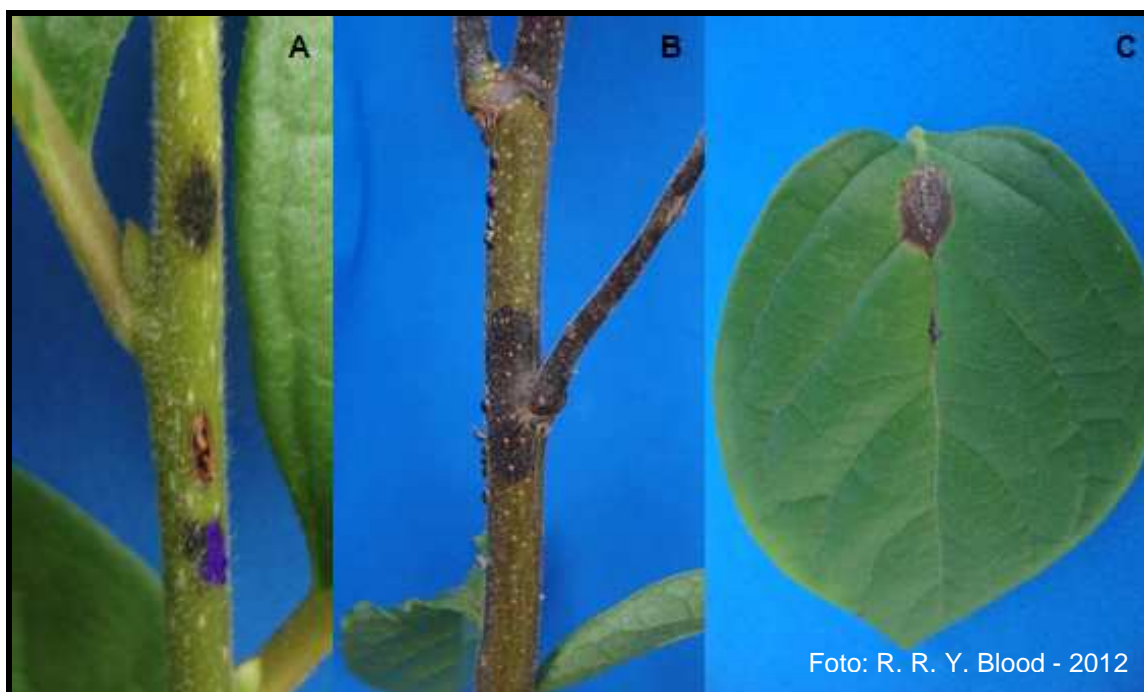


FIGURA 1 - TESTE DE PATOGENICIDADE COM SUPENSÃO DE CONÍDIOS (10^4 .mL⁻¹), EM RAMOS DE CAQUIZEIRO, A - INFECÇÃO SEM FERIMENTO, B - CRESCIMENTO DO PATÓGENO DO RAMO DO ANO PARA O RAMO DE UM ANO, C - LESÃO ESPORULADA EM FOLHA DE CAQUIZEIRO.

4.2 AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM RAMOS E FRUTOS

No teste de agressividade de isolados de *Colletotrichum* spp. em ramos do ano, quando a inoculação foi realizada com ferimento, resultou em 100% de infecção, já em ramos sem ferimento 31% dos isolados não causaram infecção (TABELA 4).

Dentre os isolados, quando inoculados com ferimento, 42% causaram morte de ramos e para sem ferimento este índice foi de em 23%. Para os isolados avirulentos em ramo sem ferimento, 50% foram oriundos de ramos e 50% de frutos. Os isolados Co 15 - CGS e Co 14 - QB foram os mais agressivos com e sem ferimento (TABELA 4).

TABELA 4 - AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM RAMOS DO ANO DE CAQUIZEIRO FUYU AOS 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO, CURITIBA-PR.

Isolado	Comprimento das lesões em ramos (mm)									
	Com ferimento					Sem ferimento				
	1	2	3	Média ¹		1	2	3	Média ²	
Co 15-CGS	10*	20*	11	13,7	a	12*	15*	11*	12,7	a
Co 14-QB	12*	14	12	12,7	a	9*	13*	19	13,7	a
Co 09-CGS	11	11	13	11,7	a	0	0	0	0,0	b
Co 03-CGS	11*	15	7	11,0	a	0	0	0	0,0	b
Co 11-BS	13	10	8	10,3	a	10	4	0	4,7	b
Co 10-CGS	8	10	9	9,0	b	3	11	14	9,3	a
Co 06-CGS	15*	6	6	9,0	b	8	1	0	3,0	b
Co 02-CGS	7*	6	11	8,0	b	1	0	0	0,3	b
Co 04-CGS	7	10*	6	7,7	b	0	0	0	0,0	b
Co 18-LP	11	6	6	7,7	b	1	0	0	0,3	b
Co 16-CGS	7	8	6	7,0	b	14*	1	1	5,3	b
Co 17-CGS	6	8	6	6,7	b	6	2	0	2,7	b
Co 13-BS	6	8	6	6,7	b	1	1	0	0,7	b
Co 07-LP	6	7	6	6,3	b	0	0	0	0,0	b
Média				9,1	A				3,7	B
CV%				14,32					37,3	

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* Ramos anelados, pelo patógeno, causando morte do ramo.

¹ Dados transformados, por \sqrt{x}

² Dados transformados, por $\sqrt{x+1}$

Os sintomas causados nas mudas inoculadas por *Colletotrichum* spp. no teste de agressividade foram cancrios e morte de alguns ramos (FIGURA 2)

Assim como para ramo, no teste de agressividade de *Colletotrichum* spp. em frutos, com ferimento todos os isolados resultaram em infecção, e sem ferimento apenas 21% dos isolados foram avirulentos, dois isolados de ramo e um de folha. Os isolados Co 09-CGS, Co 15 CGS, Co 14-QB, Co-10-CGS, Co 13-BS e Co 11-BS tiveram maior índice da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Os isolados Co 09-CGS, Co 15-CGS, Co 14-CGS, Co 10-CGS e Co 11-BS foram os mais agressivos com e sem ferimento (TABELA 5).

Nos dois testes de agressividade, o isolado Co 07-LP se destacou por ser o único dependente de ferimento para infectar tanto ramo quanto fruto.

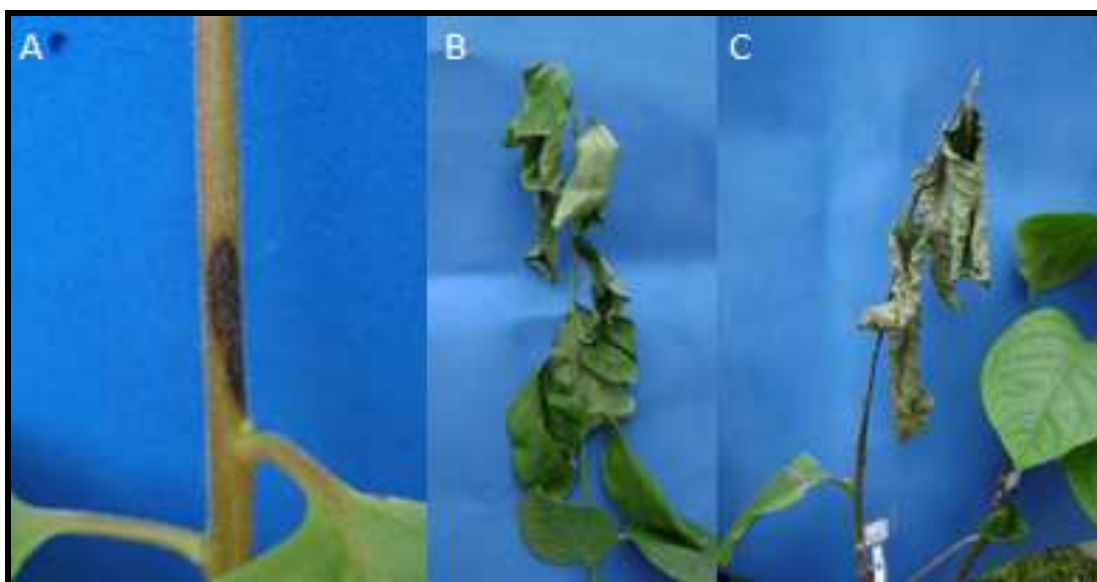


FIGURA 2 - INOCULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM MUDAS DE CAQUIZEIRO "FUYU". A - CANCRO APÓS 5 DIAS DA INOCULAÇÃO. B - RAMO ANELADO PELO PATÓGENO, COM FOLHAS MURCHAS. C - RAMO MORTO PELO ANELAMENTO 15 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO.

Os sintomas causados pela inoculação dos isolados de *Colletotrichum* spp. em fruto de caqui da cultivar Fuyu foram manchas circulares necróticas (FIGURA 3).

TABELA 5 - AGRESSIVIDADE AVALIADA PELO PERÍODO DE INCUBAÇÃO, AACPD E DIÂMETRO DA LESÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. EM FRUTOS DE CAQUI FUYU, CURITIBA-PR, 2011.

Isolado	Com fermento				Sem Ferimento			
	Período incubação	AACPD ³	Diâmetro da lesão ^{1,4}		Período incubação	AACPD ³	Diâmetro da lesão ^{2,4}	
Co 09-CGS	4	126,3 a	19,3	a	6	36,3 a	5,0	a
Co 15-CGS	3	123,2 a	17,4	a	4	36,5 a	4,8	a
Co 14-QB	3	117,8 a	17,5	a	6	37,7 a	5,6	a
Co 10-CGS	3	114,6 a	16,3	a	4	37,5 a	4,6	a
Co 13-BS	4	111,5 a	16,8	a	>12	0 b	0,0	c
Co 11-BS	3	109,8 a	15,1	a	6	35,6 a	5,1	a
Co 06-CGS	3	105,5 b	12,3	b	>12	0 b	0	c
Co 18-LP	4	100,2 b	17,4	a	12	4,8 b	2,4	b
Co 04-CGS	4	100 b	19,0	a	12	11,1 b	2,5	b
Co 16-CGS	4	92,9 b	13,5	b	>12	1,8 b	0,9	c
Co 03-CGS	6	77,8 b	15,8	a	>12	9,5 b	1,9	b
Co 17-CGS	6	59,8 c	9,9	b	6	17,5 b	2,5	b
Co 02-CGS	6	51,9 c	9,4	b	>12	2,1 b	0,8	c
Co 07-LP	12	12,2 d	3,5	c	>12	0 b	0	c
Média		93,1 A	14,5	A		16,4 B	2,2	B
CV%		20,4	17,4			43,2	30,0	

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* Ramos anelados, pelo patógeno, causando sua morte

¹ Dados transformados, por \sqrt{x}

² Dados transformados, por $\sqrt{x+1}$

³ Área abaixo da curva do progresso da doença

⁴ Diâmetro (mm) medido aos 12 dias após a inoculação

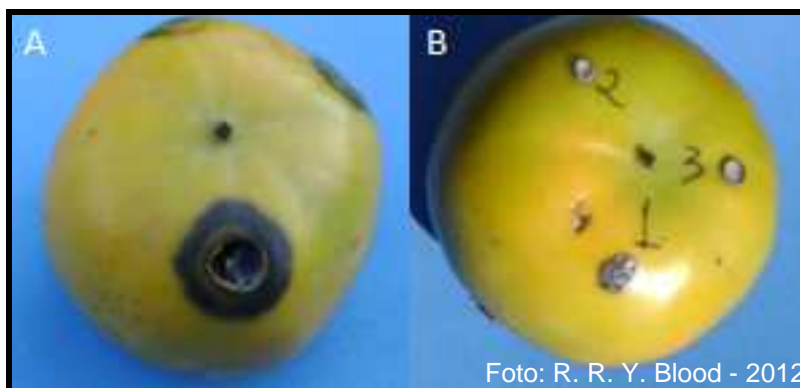


FIGURA 3. INOCULAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. EM FRUTOS DE CAQUI DA CULTIVAR FUYU, SEIS DIAS APÓS INOCULAÇÃO. A - COM FERIMENTO, B - SEM FERIMENTO

No teste de agressividade, para 75% dos isolados de *Colletotrichum spp.* de ramo, em frutos com fermento, o período de incubação foi de 3 a 4 dias e para 25% foi de 12 dias. Quanto aos os isolados de fruto, para 66% o período de incubação foi entre 3 a 4 dias e para 33% o período foi de 6 dias. Nos frutos sem fermento, 25% dos isolados de ramos apresentaram período de incubação de 6 dias e em 75% o período de incubação foi de 12 ou mais dias. Já os isolados de fruto, 55% apresentaram período de incubação de 4 a 6 dias e 45% período de incubação de 12 ou mais dias (FIGURA 4).

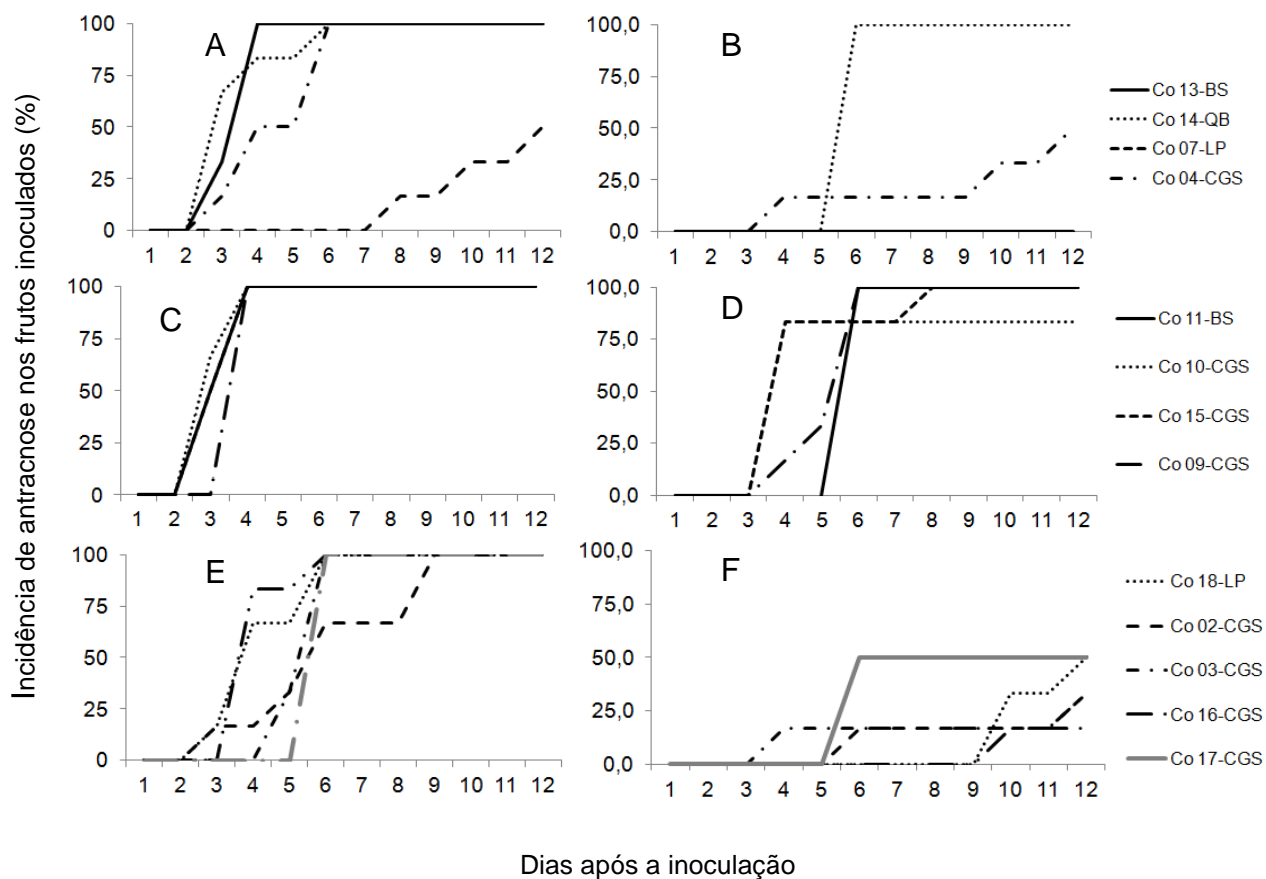


FIGURA 4 - INCIDÊNCIA DE ANTRACNOSE EM TESTE DE AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM SPP.* EM FRUTOS DE CAQUI, A - ISOLADOS DE RAMO, INOCULAÇÃO COM FERIMENTO, B - ISOLADOS DE RAMO, INOCULAÇÃO SEM FERIMENTO, C - ISOLADOS DE FRUTO, INOCULAÇÃO COM FERIMENTO (MAIOR AACPD COM FERIMENTO), D - ISOLADOS DE FRUTO, INOCULAÇÃO SEM FERIMENTO (MAIOR AACPD COM FERIMENTO), E - ISOLADOS DE FRUTO, INOCULAÇÃO COM FERIMENTO (MENOR AACPD COM FERIMENTO), F - ISOLADOS DE FRUTO, INOCULAÇÃO SEM FERIMENTO (MENOR AACPD COM FERIMENTO)

4.3 CARACTERIZAÇÃO CULTURAL

As características das culturas de 14 isolados de *Colletotrichum spp.* demonstraram que no verso as colônias apresentaram coloração acinzentada uniforme e aspecto aveludado e no reverso as colônias eram escuras e concêntricas com exceção dos isolados Co 07-LP, Co 15 CGS e Co 18 LP (TABELA 6 e FIGURA 5).

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DE VERSO E REVERSO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum spp.* EM MEIO BATATA DEXTROSE E ÁGAR (BDA), A 25°C.

Isolado	Verso		Reverso
	Coloração	Aspecto micelial	
Co02-CGS	Cinza (uniforme)	Aveludado	Escuro do centro até as bordas
Co 03-CGS	Cinza (uniforme)	Aveludado	Escuro/ concêntrico
Co 04-CGS	Marrom acinzentado (uniforme)	Aveludado	Escuro/ concêntrico
Co 06-CGS	Cinza claro (uniforme)	Aveludado	Amarelo claro, concêntrico
Co 07-LP	Cinza claro (uniforme)	Aveludado	Amarelo claro, concêntrico
Co 09-CGS	Marrom escuro p/ cinza (uniforme)	Aveludado	Escuro do centro até as bordas
Co 10-CGS	Marrom acinzentado (uniforme)	Aveludado	Escuro/ concêntrico
Co 11-BS	Marron acinzentado (uniforme)	Aveludado	Escuro/ concêntrico
Co 13-BS	Cinza escuro (uniforme)	Aveludado	Escuro/ concêntrico com manchas mais escuras
Co 14QB	Marrom acinzentado do centro p. bordas (uniforme)	Aveludado	Claro no centro, concêntrico escurecendo p. bordas
Co 15-CGS	Cinza claro (uniforme)	Aveludado	Marrom claro concêntrico
Co 16-CGS	Marrom acinzentado (uniforme)	Aveludado	Escuro/ concêntrico
Co 17-CGS	Cinza claro (uniforme)	Aveludado	Escuro / concêntrico com bordas mais escuras
Co 18-LP	Cinza claro (uniforme)	Aveludado	Escuro/ concêntrico, com manchas mais escuras

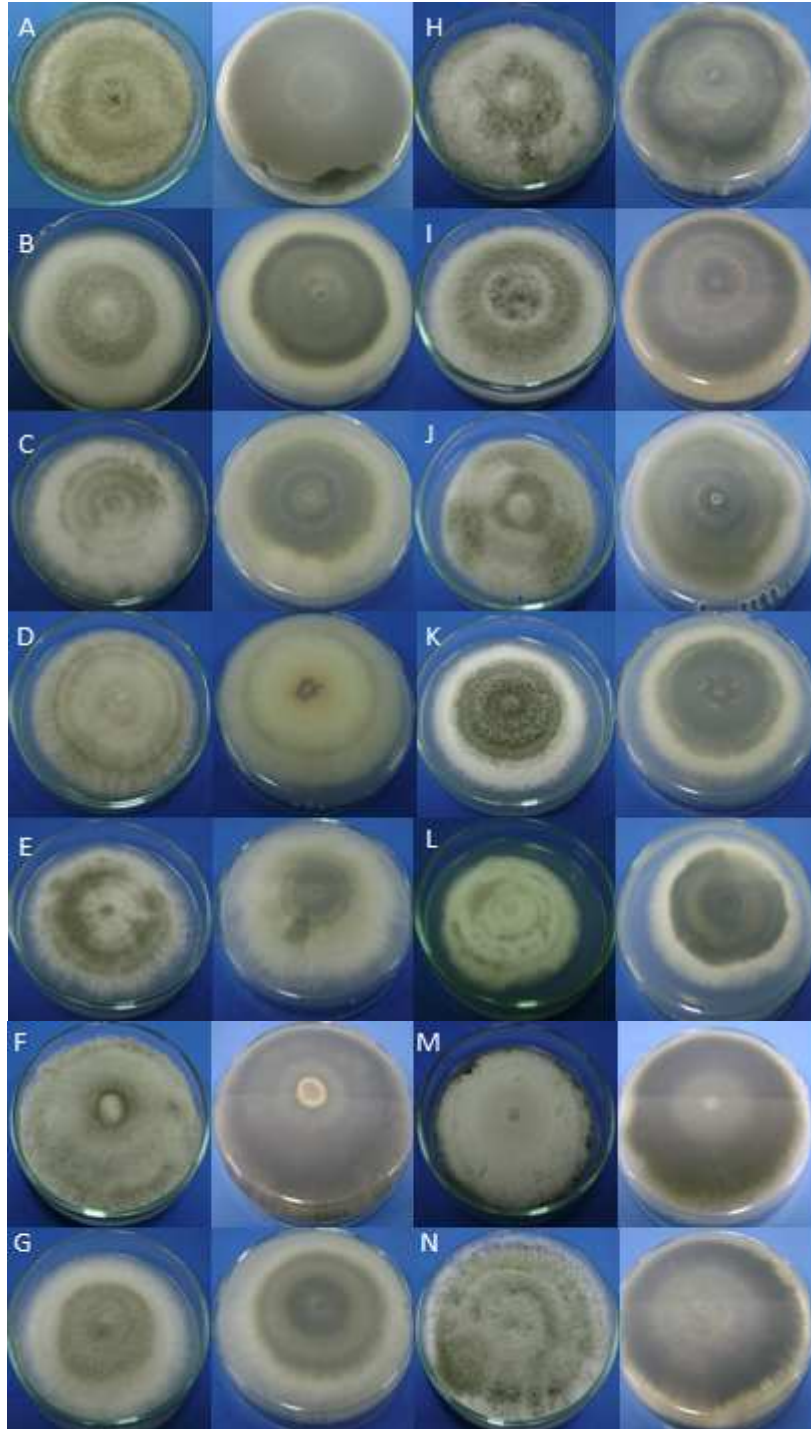


FIGURA 5. CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DE VERSO E REVERSO DOS ISOLADOS DE *Colletrichum* sp. EM MEIO BDA. A- Co 02-CGS. B- Co 03-CGS. C- Co 04-CGS. D- Co 06-CGS. E- Co 07-LP. F- Co 09-CGS. G- Co 10-CGS. H- Co 11-BS. I- Co 13-BS. J- Co 14-QB. K- Co 15-CGS. L- Co 16-CGS. M- Co 17-CGS. N- Co 18-LP.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

Após modelagem com a equação da beta generalizada, foi estimada a temperatura mínima e máxima para o crescimento micelial de quatro isolados dois de fruto, Co 02-CGS e Co 09-CGS e dois de ramo Co 07-LP e Co 13-CGS. De acordo com a equação foi observado que todos os isolados apresentaram a temperatura máxima variando entre de 31 e 31,5°C, e a temperatura mínima entre 4,29 a 5,30°C. Todos os isolados apresentaram queda acentuada do crescimento micelial entre 25°C e 31°C, estando à temperatura ideal próxima de 25°C (FIGURA 6).

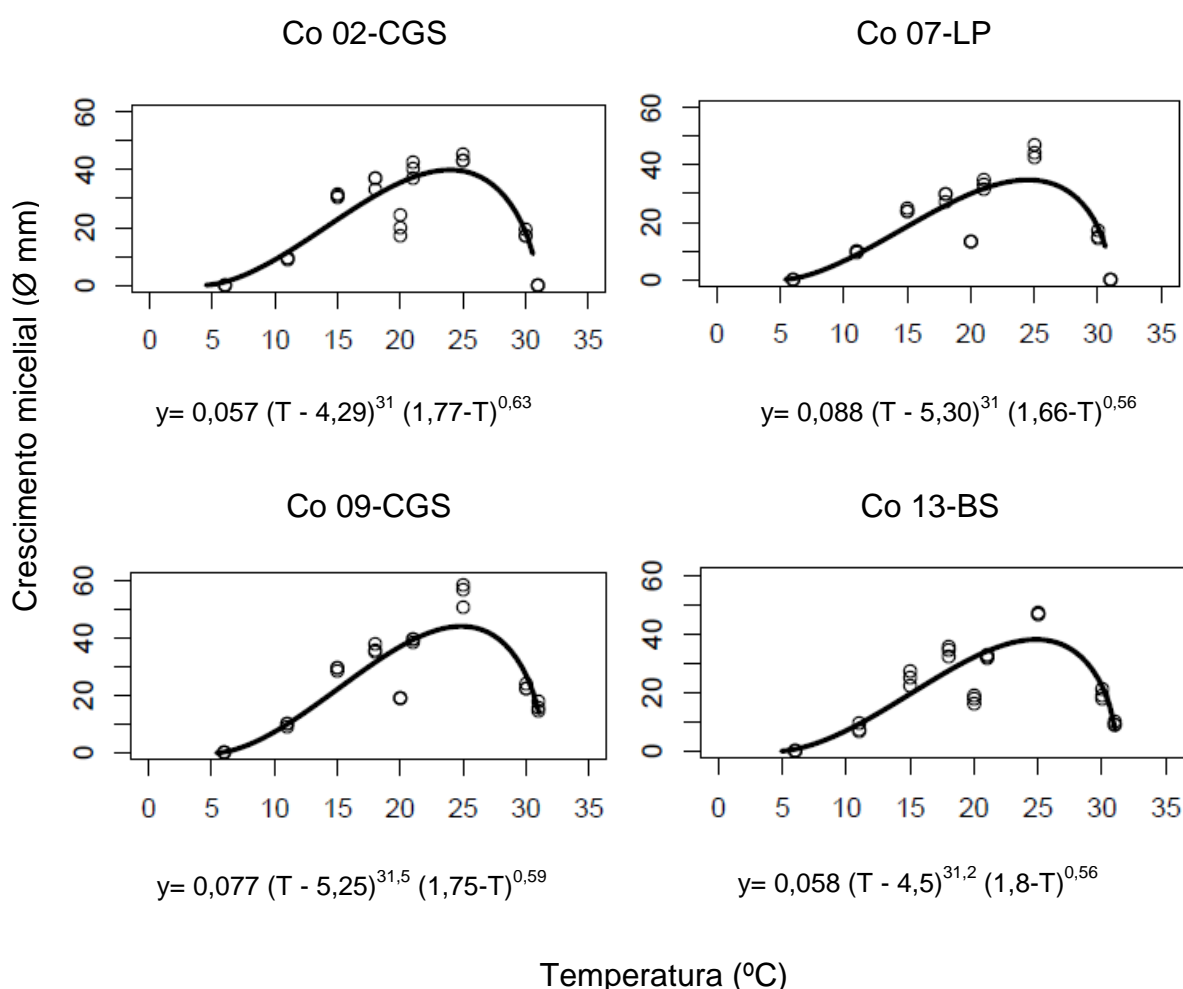


FIGURA 6 - CRESCIMENTO MICELIAL, REPRESENTADO PELO DIÂMETRO DE COLÔNIAS, DE 4 ISOLADOS DE *Colletotrichum spp.*, DE CAQUIZEIRO, EM MEIO BDA, APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO REALIZADO EM TRÊS ENSAIOS DE TEMPERATURAS: NO PRIMEIRO 6, 11, 21, E 31°C, NO SEGUNDO 15, 18 E 25°C E NO TERCEIRO 20 E 30°C (CULTURAS EM AUSÊNCIA DE FOTOPERÍODO).

Na avaliação do crescimento micelial em diferentes temperaturas o isolado CO09-CGS obteve o melhor crescimento a 25°C e também a 31°C sendo que nesta temperatura os isolados Co 02-CGS e Co07-LP não tiveram nenhum crescimento. (TABELA 7).

TABELA 7 - CRESCIMENTO MICELIAL (\emptyset , mm), DE 4 ISOLADO DE *Colletotrichum spp.* EM NOVE TEMPERATURAS DIFERENTES.

Isolados	Temperaturas								
	6 °C	11 °C	15 °C	18 °C	20°C	21 °C	25 °C	30°C	31 °C
Co 02-CGS	0 a	9 a	31 a	35,7 a	20,3 a	40,0 a	43,8 b	17,3 b	0 c
Co 07-LP	0 a	9,3 a	23,8 b	28,7 b	13 b	33,0 b	44,5 b	15,3 c	0,0 c
Co 9-CGS	0 a	9,7 a	29,2 a	36,0 a	19 a	39,2 a	55,0 a	22,6 a	16,0 a
Co 13- BS	0 a	9,8 a	25,0 b	34,2 a	17,6 a	32,2 b	46,7 b	19,3 b	9,3 b

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As sequências de nucleotídeos foram comparados com sequências de espécies referência dos principais complexos *Colletotrichum*, sendo eles *C. gloesporioides* (JX010152), *C. boninense* (JX010292), *G. acutata* (JQ948377). Espécies referências de *C. horii* foram utilizadas porque revelaram similaridade entre 97,6-100% para os isolados quando comparados com sequências disponíveis no GenBank fazendo uso do programa BLASTX e a árvore filogenética gerada confirma a identificação dos isolados como pertencentes a espécie *C. horii*. Entretanto, revela haver variabilidade para o isolado Co 06-CGS. Tal isolado apresentou similaridade de 92% com a espécie *C. cliviae* (JN715845) usando sequências do GenBank. Os isolados Co 13-BS, Co 18-LP, Co 25-CGS, Co 42-CGS e Co 43-CGS, não foram caracterizados molecularmente (FIGURA 7).

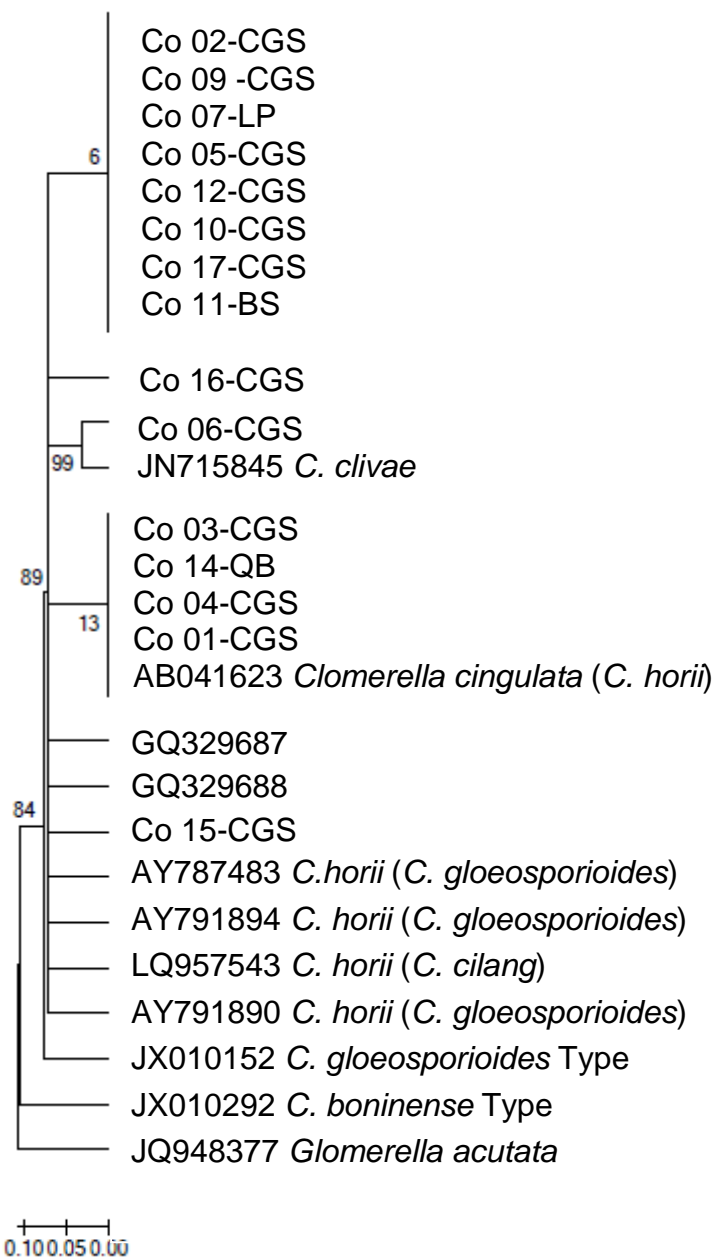


FIGURA 7. DENDROGRAMA FILOGENÉTICO BASEADO NA ANÁLISE “NEIGHBOUR-JOINING” COM BASE NA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. E 6 ISOLADOS REFERÊNCIA DE *C. horii*. VALORES DE BOOTSTRAP (1.0000 REAMOSTRAGENS).

4.6 DESENVOLVIMENTO DA ANTRACNOSE DO CAQUIZEIRO NO CAMPO

4.6.1 Queda de frutos assintomáticos

Avaliando a queda de frutos assintomáticos de caqui das cultivares Fuyu e Kakimel, durante os ciclos de 2010/11 e 2011/12, verificou-se que para Fuyu a queda inicia 40 dias após a floração e se estabiliza ao redor dos 100 dias após a floração. Para kakimel a queda iniciou próxima dos 70 dias após a floração no ciclo de 2010/11 e aos 40 dias no ciclo seguinte, tendo se estabilizado entre 120 e 140 dias após a floração, nos dois ciclos (FIGURA 8).

Para cultivar Fuyu o pomar a teve produtividade média, nos dois ciclos avaliados, de 10 t.ha⁻¹ e peso médio do fruto de 117 g. Para cultivar Kakimel o pomar teve produtividade média nos dois ciclos de 40 t.ha⁻¹ e peso médio do fruto de 235 g.

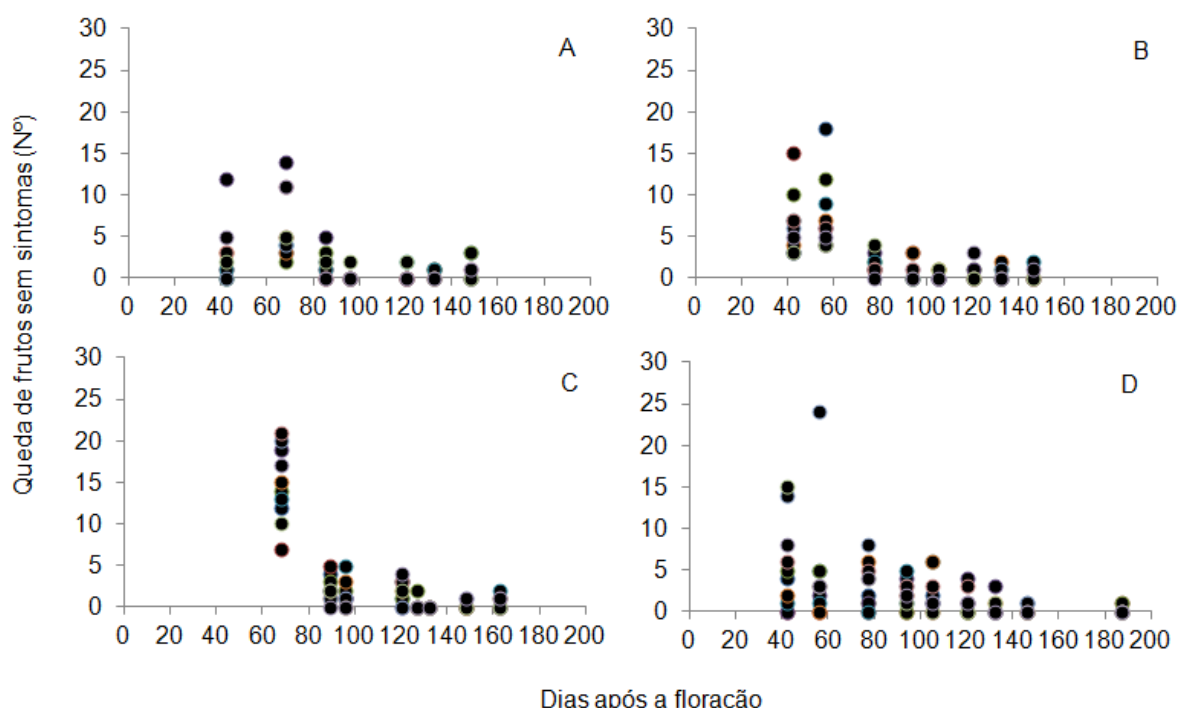


FIGURA 8 - QUEDA DE FRUTOS ASSINTOMÁTICOS (Nº) NOS 10 RAMOS MARCADOS, NAS 10 PLANTAS SELECIONADAS, A - FUYU, CICLO 2010/11, B. FUYU, CICLO 2011/12, C - KAKIMEL, CICLO 2010/11, D. KAKIMEL, CICLO 2011/12.

4.6.2 Queda de frutos sintomáticos

Ao avaliar a queda de frutos com sintomas de antracnose nas cultivares Fuyu e Kakimel, nos dois ciclos, verificamos que no ciclo de 2010/11, a queda teve início ao redor dos 120 dias após a floração, para as duas cultivares, no entanto para 'Fuyu' a queda aumentou até a colheita e para 'Kakimel' houve redução. Já no ciclo de 2011/12 o início da queda foi ao redor de 80 dias após a floração, nas duas cultivares, sendo que para 'Fuyu' se manteve constante até a colheita e para 'kakimel' houve aumento acentuado da queda até a colheita (FIGURA 9).

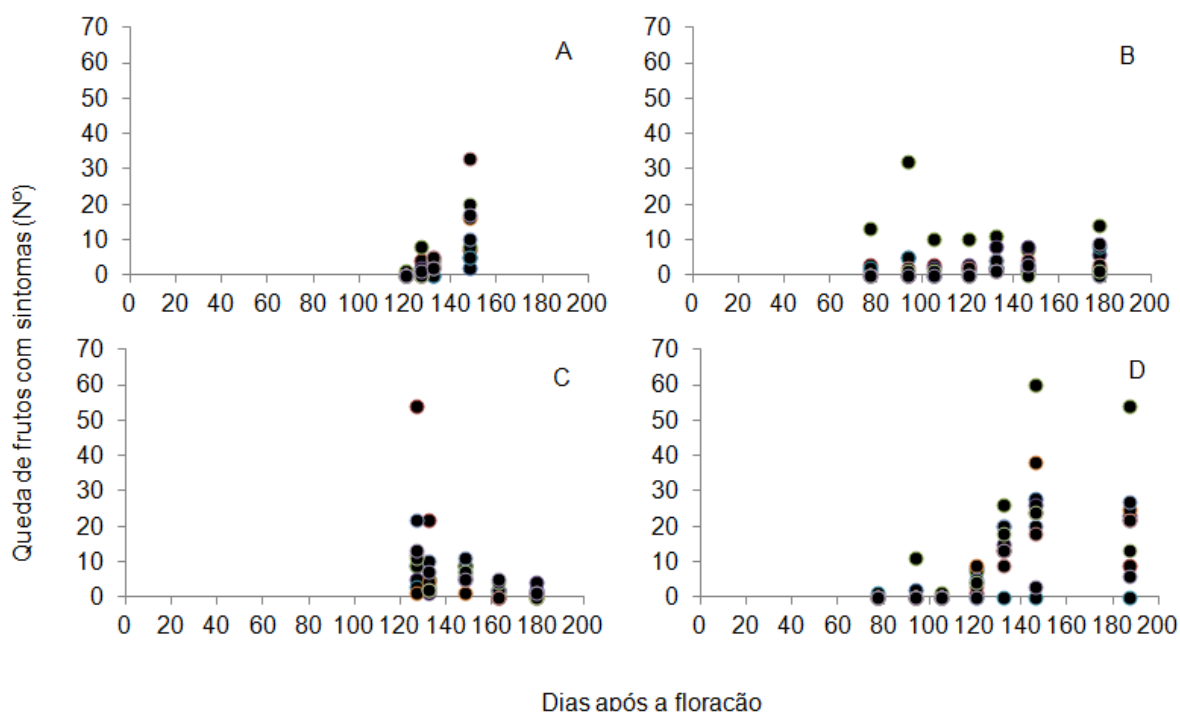


FIGURA 9 - QUEDA DE FRUTOS COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE (Nº), NAS 10 PLANTAS SELECIONADAS, A - FUYU, CICLO 2010/11, B. FUYU, CICLO 2011/12, C - KAKIMEL, CICLO 2010/11, D. KAKIMEL, CICLO 2011/12.

Para Fuyu, os danos totais causados pela queda de frutos com sintoma de antracnose em 2010/11 foram de 7,46% e em 2011/12 foram de 19,48%. Para kakimel, os danos totais causados pela queda de frutos com sintoma de antracnose foram de 4,31% e 5,93% nos ciclos 2010/11 e 2011/12, respectivamente.

4.6.3 Infecção de *Colletotrichum spp.* na flor de caquizeiro

Na avaliação de *Colletotrichum spp.* em flores foram observados sinais de esporulação após 7 dias de câmara úmida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (FIGURA 10). A incidência de antracnose em flores de caqui 'Fuyu' foi de 36% e em 'kakimel' foi de 61%, ambos no ciclo de 2011/12 (FIGURA 11).

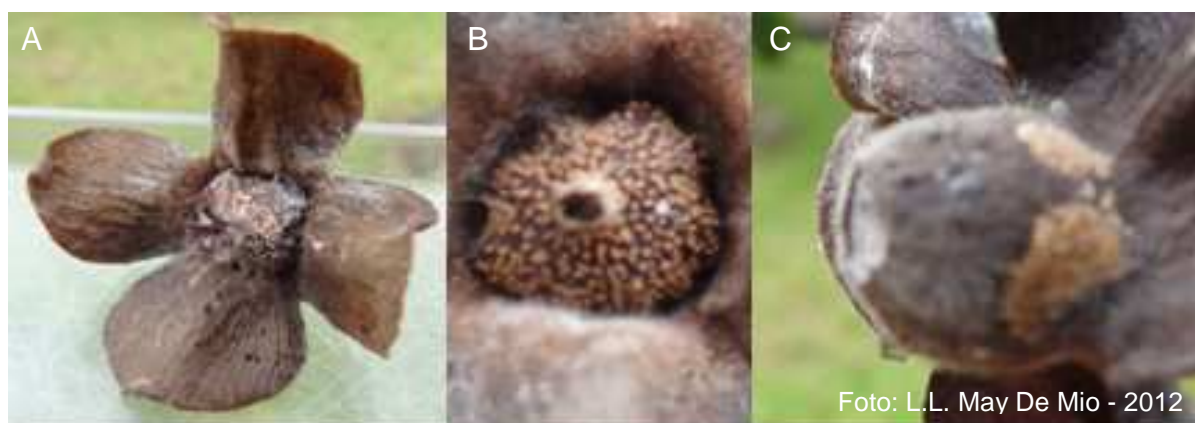


FIGURA 10 - SINAIS DE *Colletotrichum spp.* EM FLORES DE CAQUI FUYU, A E B. INCIDÊNCIA NO OVÁRIO, C. INCIDÊNCIA NA BASE DA SÉPALAS.

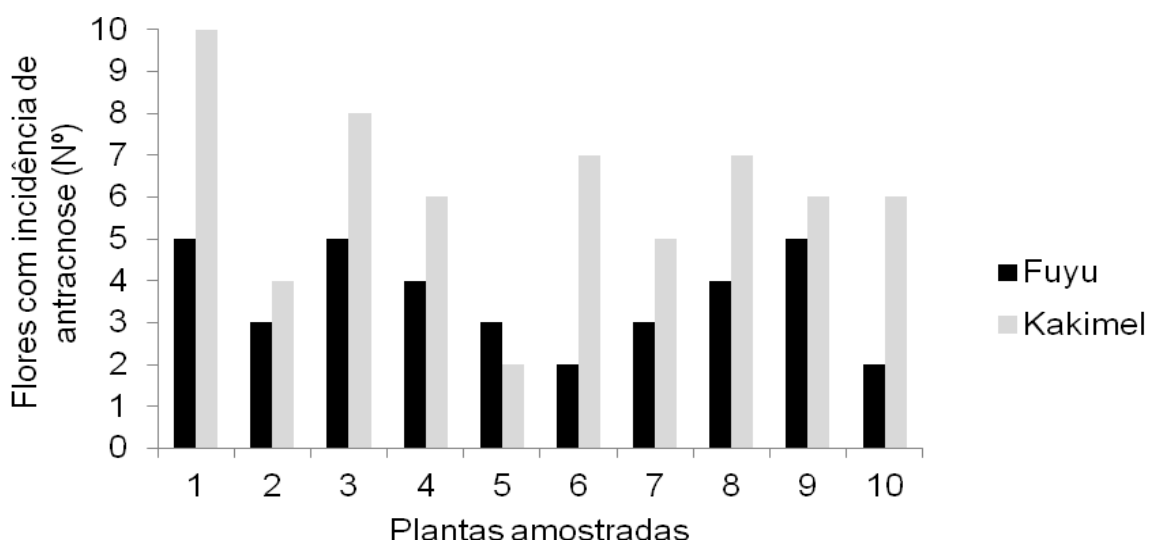


FIGURA 11 - NÚMERO DE FLORES COM INCIDÊNCIA DE ANTRACNOSE, EM 10 FLORES AVALIADAS EM 10 ÁRVORES MARCADAS DAS CULTIVARS FUYU E KAKIMEL.

4.6.4 Infecção latente de *Colletotrichum spp.*, em frutos verdes de caqui

No ciclo 2010/11, a incidência de *Colletotrichum spp.* latente em caqui 'Fuyu', foi observada aos 120 e 150 dias, após plena floração, em 78% dos frutos nas duas avaliações. Em 'Kakimel' a incidência foi de 61% aos 120 dias e 37% aos 150 dias. No ciclo seguinte a incidência foi observada aos 90, 120 e 150 dias, após plena floração, para as duas cultivares, sendo 9, 20 e 17%, respectivamente para 'Fuyu' e 24, 30 e 14%, respectivamente para 'kakimel'. A AACPD das duas cultivares, nos dois ciclos avaliados, obtiveram os maiores valores aos 120 dias, após a plena floração. (TABELA 8).

TABELA 8 - INFECÇÃO LATENTE DE *Colletotrichum spp.* EM FRUTOS DE CAQUI FUYU E KAKIMEL AOS 90, 120 E 150 DIAS APÓS PLENA FLORAÇÃO, CURITIBA-PR.

Dias de Câmara úmida	Fuyu ³					Kakimel ⁴				
	2010/11		2011/12			2010/11		2011/12		
	120 ²	150 ²	90 ²	120 ²	150 ²	120 ²	150 ²	90 ²	120 ²	150 ²
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	1,7	0	0	0	0
4	47	9	0	0	0	39	10	0	0	4
5	78	57	0	20	10	61	29	0	30	14
6	78	69	9	20	17	61	35	17	30	14
7	78	78	9	20	17	61	37	24	30	14
AACPD ¹	242,0	173,7	14,0	50,0	39,4	193,2	104,7	28,7	75,0	39,0

¹ Área abaixo da curva do progresso da doença

² Dias após a plena floração

³ Cultivo orgânico

⁴ Cultivo convencional

4.6.5 Incidência de antracnose em frutos pós-colheita

A incidência de sinais do patógeno (FIGURA 12), após 18 dias de pós-colheita foi observada nas cultivares Fuyu e kakimel, nos dois ciclos. Para a cultivar

Fuyu, no ciclo de 2010/11 a incidência foi de 12% e 4%, para frutos desinfestados e não desinfestados, respectivamente e no ciclo seguinte foi de 4 e 7%. Para cultivar Kakimel ,no ciclo 2010/11, a incidência foi de 3 e 5% para frutos desinfestados e não desinfestados, respectivamente e em 2011/12 o percentual foi de 1 e 0% , respectivamente (TABELA 9).

TABELA 9 - INCIDÊNCIA (%) DE ANTRACNOSE EM CAQUI FUYU E KAKIMEL EM PÓS-COLHEITA NAS SAFRAS 2010/11 E 2011/12 SOB CONDIÇÕES DE 25°C E FOTOPERÍODO DE 12 HORAS.

Dias após colheita	Fuyu ¹				Kakimel ²			
	Desinfestados*		Não desinfestados		Desinfestados*		Não desinfestados	
	2010/11	2011/12	2010/11	2011/12	2010/11	2011/12	2010/11	2011/12
9	11	3	0	4	0	1	0	0
13	11	4	1	7	3	1	2	0
18	12	4	4	7	3	1	5	0

¹ Cultivo orgânico

² Cultivo convencional

* Desinfestação realizada com 10 L de solução com 160 mL de hipoclorito (400 ppm) + 160 ml de etanol + 0,5 ml de tween-20, por 4 minutos

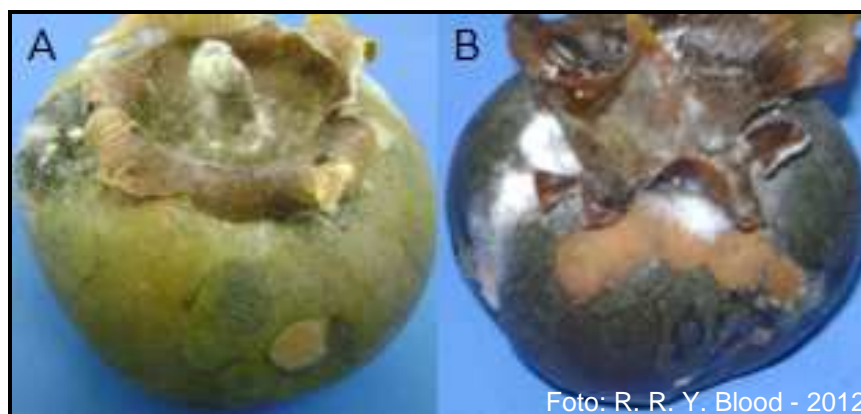


Foto: R. R. Y. Blood - 2012

FIGURA 12. FRUTOS DE CAQUI COM SINAIS DE *Colletotrichum spp.* APÓS SEREM SUBMETIDOS A DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL E CONGELAMENTO POR 15 HORAS E ACONDICIONADOS EM CÂMARA ÚMIDA A 25°C \pm 2 E FOTOPERÍODO DE 12 HORAS, APÓS 5 DIAS, PARA EXPRESSÃO DA INFECÇÃO LATENTE, **A** - CULTIVAR FUYU, **B** - CULTIVAR KAKIMEL.

4.7 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NOS CICLOS DE 2010/11 E 2011/12

Considerando as variáveis climáticas: umidade relativa média, temperatura média e precipitação acumulada, nos dez dias anteriores de cada período avaliado (TABELA 10), para cultivar Fuyu, verificou-se que não houve correlação entre estas variáveis, o número de frutos caídos sem sintoma e número de frutos caídos com sintomas. Todavia quando foi avaliada a correlação entre dias após a floração e o número de frutos caídos com sintomas, esta apresentou coeficiente de correlação de Pearson de 0,61 e valor de $p = 0,0030$, indicando que quanto maior o número de dias após a floração, maior o número de frutos caídos com sintoma.

Para 'kakimel', o comportamento foi semelhante sendo que a correlação entre dias após a floração e número de frutos caídos com sintoma apresentou coeficiente de correlação de Pearson de 0,58 e valor de $p = 0,0037$.

TABELA 10 - VARIÁVEIS CLIMÁTICAS: UMIDADE RELATIVA (UR), TEMPERATURA MÉDIA (T. MÉD) E PRECIPITAÇÃO ACUMULADA (PREC), FORNECIDAS PELO SIMEPAR E COLETADAS NA ESTAÇÃO CLIMATOLÓGICA DE PINHAIS-PR (REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA).

2010/11				2011/12			
Dias após a floração	Clima ¹			Dias após a floração	Clima ¹		
	U. R. (%)	T. Méd. (°C)	Prec. (mm)		U. R. (%)	T. Méd. (°C)	Prec. (mm)
0*	86,499	14,3976	54,8	0**	86,6	15,6	34,6
29	86,5	16,2	12,4	24	88,3	16,7	47,4
42	87,9	19,8	92,2	42	86,5	18,1	43,8
68	89,2	20,9	131,6	56	71,6	20,2	17,2
89	89,3	20,9	115,6	77	85,9	19,3	35,2
96	89,8	21,2	213,0	94	89,7	20,1	67,4
120	88,1	21,1	122,8	105	79,3	21,8	0,0
127	89,8	20,5	101,0	120	88,4	20,4	81,0
132	88,5	20,9	75,4	132	86,5	21,7	15,4
148	91,8	18,8	36,2	146	84,0	19,6	22,2
163	90,3	19,6	53,4	187	88,0	19,8	51,2
179	86,7	18,3	34,2	-	-	-	-

¹ Dados referentes aos 10 dias anteriores ao período avaliado

* Final da floração (20 de outubro de 2010)

** Final da floração (25 de outubro de 2011)

5 DISCUSSÃO

No teste de agressividade em ramo observou-se que aparentemente não há especificidade entre isolados de ramo e fruto quanto a capacidade para infectar a parte vegetal, pois o isolado Co15-CGS, de fruto e o isolado Co14-QB, de ramo, apresentaram os maiores comprimentos de lesões em ramos inoculados com e sem ferimento e também foram capazes de causar a morte destes. Também ficou evidente que o ferimento favoreceu o processo de infecção, podendo sua ausência ser motivo de impedimento, como ocorreu para os isolados Co 09-CGS, Co 03-CGS, Co04-CGS e Co07-LP, que não causaram lesões em ramos sem ferimento. Todavia Xie *et al.* (2010) relataram forte virulência de isolados de *C. horii* inoculados em ramos de caquizeiro, tanto com ferimento quanto sem ferimento.

Fato semelhante foi observado no teste de patogenicidade em frutos onde novamente o isolado Co15-CGS, de fruto e o isolado Co14-QB, de ramo se destacaram apresentando valores elevados de diâmetro das lesões e de AACPD, tanto com quanto sem ferimento. Entretanto, 100% dos isolados avirulentos, quando inoculados sem ferimento, eram oriundos de ramos, demonstrando alguma especificidade quando inoculados em frutos. A maioria dos isolados, 69%, quando inoculados com ferimento, apresentou período de incubação ao redor de 3-4 dias, este resultado corrobora com os relatados por Xie *et al.* (2010), que relataram período de incubação de 3 dias em isolados de *C. horii* inoculados em ramos de caquizeiro. O mesmo foi observado por Williamson e Sutton (2010) em inoculação de *C. acutatum* em frutos de caqui.

Na avaliação das características culturais, as colônias apresentaram, em sua maioria, coloração acinzentada e aspecto aveludado, fundo da placa escuro e concêntrico, mas não apresentaram sinais de esporulação nem presença de setas. Xie *et al.* (2010) observaram resultados semelhantes para característica da cultura que apresentaram coloração cinza escuro para cinza e aspecto aveludado, fundo da placa cinza escuro a marrom escuro com zona concêntrica e também não apresentaram setas, porém as colônias desenvolveram grande número de massa de conídios alaranjados. Para *C. acutatum* em caqui as colônias também apresentaram micélio aéreo cinza, fundo da placa de coloração marrom e uma bege, mas apresentaram massa de conídios de cor salmão no centro das placas (WILLIAMSON;

SUTTON, 2010). Diferentemente, *C. gloesporioides*, em maracujá, desenvolveu micélio de cor branca, cinza claro, cinza escuro, oliva escuro e rosa (ALMEIDA; COELHO, 2007).

Andrade *et al.* (2007) dividiram 33 isolados de *Colletotrichum spp* de mamão em grupos de acordo com as características de coloração da colônia, sendo Grupo A - salmão, B- cinza escuro, C- Cinza escuro no centro e branca ao redor, D- cinza claro no centro com bordas brancas, E- branca, F- cinza claro no centro com abundante esporulação no centro e G- negra, mostrando a grande variabilidade que pode haver nas características culturais do gênero *Colletotrichum*.

Na caracterização fisiológica a temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno foi próxima de 25°C, resultado também encontrado por Xie *et al.* (2010). Nesta temperatura o isolado Co 09-CGS obteve o melhor desenvolvimento micelial. Este mesmo isolado obteve as maiores lesões nos teste de patogenicidade tanto em ramo quanto em fruto, indicando que pode haver relação entre maior crescimento micelial e maior agressividade do patógeno. Este resultado corrobora com o encontrado para isolados de *C. gloesporioides* de jiló, que demonstraram melhor índice de crescimento micelial entre 25 e 28°C e *C. acutatum* apresentou melhor índice próximo a 28°C (TOZZE JUNIOR; MELLO; MASSOLA JUNIOR, 2006). Em cafeeiro, a temperatura ótima para crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum spp.*, no estado de Minas Gerais ficou entre 22 e 28°C (DIAS, *et al.*, 2004)

O gênero *Colletotrichum* inclui um grande número de patógenos de plantas de grande importância. É o agente causal da antracnose e outras doenças nas folhas, caules e frutos várias espécies de plantas, incluindo culturas importantes (CAY *et al.*, 2009). Com distribuição principalmente tropical e subtropical, embora haja algumas espécies de alto perfil que afetam culturas de clima temperado (CANNON *et al.*, 2012).

A identificação correta é crítica para o entendimento da epidemiologia da doença e o desenvolvimento efetivo do controle. A identificação baseada na morfologia de espécies de *Colletotrichum* sempre foi problemática por que tais características são pouco confiáveis e muitos destas são plásticas dependendo de métodos e condições experimentais (HYDE *et al.*, 2009).

O rápido progresso de métodos em filogenia molecular torna possível o reconhecimento estável do gênero *Colletotrichum* (CAI *et al.*, 2009, DAMM *et al.*, 2012, CANNON *et al.*, 2012). Entretanto a análise filogenética de um único gene não

consegue ser muito eficiente na delimitação de algumas espécies. Isto se deve em parte ao nível elevado de nomes incorretos no GenBank (HYDE et al., 2009).

Devido à complexidade e ampla diversidade genética e biológica, a partir de 2010, várias espécies de *Colletotrichum* foram agrupadas dentro do Complexo *C. gloeosporioides* lato sensu, reunindo neste complexo espécies que continham semelhança na morfologia de conídios e as suas sequências ITS (Dann et al., 2010).

Neste contexto, esforços conjuntos foram realizados para resolução de complexos de espécies importantes no gênero *Colletotrichum*, tornando a identificação de agentes patogênicos mais precisa para aumentar a nossa compreensão da biologia das espécies de *Colletotrichum* (DAMM et al., 2012, CANNON et al., 2012, WEIR; JOHNSTON, 2011, WEIR et al., 2012).

Weir e Johnston (2011) caracterizaram e neotipificaram recentemente *C. horii* propondo a delimitação de espécies de *Colletotrichum* pela “*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*” (GCPSR), este conceito considera que as árvores filogenéticas de diferentes genes apresentam discordância dentro de uma espécie devido ao fluxo gênico entre indivíduos. O nó comum onde diferentes árvores de genes apresenta concordância é considerado o ponto de especiação.

A neotipificação de *C. horii* proposta por Weir e Johnston (2011) foi importante para identificação dos isolados apresentados neste estudo. Esses resultados concordam com os trabalhos anteriores que afirmam que *C. horii* provoca antracnose do caqui na China (XIE et al. 2010) e Nova Zelândia (WEIR; JOHNSTON, 2010).

Pela análise das sequências é possível verificar que o isolado Co 06-CGS apresenta uma sequência distinta aos demais isolados que agruparam com *C. horii*, entretanto é insuficiente para afirmar que seja *C. cliviae* pois o mesmo apresentou apenas 92% de similaridade com sequências do GenBank. Nilsson et al. (2006) resumiu a frequência de dados anotados incorretamente no GenBank. Hyde et al. (2010) ilustrou mais claramente este problema de filogenia com base em acessos ao GenBank e de suas sequências identificadas como *C. gloeosporioides* e *Glomerella cingulata*, como pertencentes a várias diferentes Complexos de *Colletotrichum*.

Para afirmar a correta identificação do isolado Co 06-CGS o mesmo será investigado no futuro com o sequenciamento de regiões intrônicas de outros genes, como $\alpha 1$ do Fator de alongação da Tradução (EF), Actina, GPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), sequência β -tubulina (MYLLYS; STENROOS; THELL, 2002). Entretanto, baseado nos resultados preliminares apresentado nesse trabalho é

possível afirmar que pode ocorrer mais de uma espécie de *Colletotrichum* causando antracnose em caqui no Brasil, contrapondo o que foi proposto por Weir *et al.* (2012) que afirmam que algumas espécies parecem ser especializadas aos seus hospedeiros, por exemplo, *C. horii*, *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. nupharicola*, *C. salsolae*, *C. ti*, e *C. xanthorrhoeae*.

No estudo da antracnose a campo, verificou-se que as cultivares Fuyu e Kakimel, apresentaram queda de frutos, sem sintoma de antracnose, no período de 40 a 70 dias após a plena floração. Esse resultado também ocorre na cultivar Rama Forte, pois segundo Corsato, Scarpate Filho e Verdial (2005), existe um período de abortamento natural que inicia-se quatro dias após o início do florescimento, gerando dois picos distintos na quantidade de frutos abortados. O primeiro pico ocorre aos 21 dias após o início do florescimento, onde caem, aproximadamente, 25% dos frutos e o segundo, ocorre aos 48 dias após o início do florescimento onde 39% dos frutos caem, restando ao final dos dois picos de queda aproximadamente 45% da frutificação inicial.

Segundo Gin Razouk (2007) também há um período de queda natural dos frutos nas cultivares Rubi, Taubaté, Toote e Fuyu, aos 42 dias após o florescimento, ou seja, na primeira quinzena de dezembro. Enquanto para as cultivares Pomelo, Rama Forte, Giombo e Suruga este pico é mais tardio, dos 63 aos 98 dias após o florescimento, do início de dezembro ao início de janeiro. A 'Jiro' apresenta o pico de queda mais precoce, apenas uma semana após o florescimento. Para 'Jiro' e 'Fuyu' a queda de frutos acentuadas pode ser explicada pela falta de polinização

Em relação aos frutos caídos com sintoma de antracnose verificou-se que a queda pode ocorrer a partir de 80 dias após a floração, mês de janeiro, onde é comum temperaturas médias acima de 20°C e alta precipitação acumulada, indicando que a epidemia está diretamente relacionada com as condições climáticas, todavia os dados de correlação não confirmaram esta hipótese neste caso. Segundo Yang *et al.* (2009) em ambientes chuvosos e com grande formação de orvalho a antracnose ocorre com maior severidade.

Analisando a infecção de *Colletotrichum horii* observou-se que ocorre durante todo o ciclo do caquizeiro desde a floração, frutos verdes e frutos maduros, podendo também se expressar em pós-colheita. No presente trabalho as incidências de *Colletotrichum spp.* na floração e em frutos verdes foram significativas nas fases avaliadas mas o dano final, quantificado pela queda de frutos sintomáticos, foi de

7,46% em 'Fuyu' e 4,31% em 'kakimel', no ciclo de 2010/11. Provavelmente grande parte da população de *Colletotrichum* latente, sobrevive endofiticamente nos frutos, sem causar sintomas ou qualquer dano aparente, nas condições climáticas presentes.

Nos dois ciclos e para as duas cultivares, aos 120 dias após a floração a incidência de *Colletotrichum spp.* latente em frutos verdes foi máxima, sendo que neste período segundo Mowat e George (1994) o caquizeiro está no estágio II de desenvolvimento, cuja duração varia de 20 a 40 dias, e reflete fatores de influência genética, fisiológica e ambiental, caracteriza-se por ser de transição entre o estágio I, que está associado ao processo de divisão e diferenciação celular e o III, de alongação e maturação fisiológica. Por ser o de menor duração e apresentar transformações bioquímicas, provavelmente favorece a expressão do *Colletotrichum* sp latente.

Em pós-colheita foi observado que a doença esteve presente em índices bastante variáveis, causando danos mais significativos no pomar orgânico da cultivar Fuyu, provavelmente devido ausência de tratamentos fitossanitários. Nesta cultivar, o aumento da doença no campo, refletiu diretamente na qualidade do fruto na pós-colheita. A presença de danos causados pela antracnose em frutos de caqui em pós-colheita foi relatada por Xie *et al.* (2010), porém não quantificaram esta incidência. Diferentemente do ocorrido em frutos de caqui, em pessegueiro a incidência de *C. gloeosporioides* pode atingir até 100% na pós-colheita, se estes foram inoculados 2 semanas antes do endurecimento do caroço (ZAITLIN, ZEHR, e DEAN, 2000).

6 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Colletotrichum spp.* oriundos de ramos e frutos da região metropolitana de Curitiba mostraram-se patogênicos em ramos e frutos da cultivar Fuyu, apresentando agressividade variáveis;
- As colônias dos isolados apresentaram coloração acinzentadas, com desenvolvimento micelial ideal próximo a 25°C;
- A principal espécie do agente causal da antracnose do caquizeiro na região estudada é *Colletotrichum horii*;
- No campo, para as cultivares Fuyu e Kakimel, ocorre queda de frutos com sintoma de antracnose, entre os meses de janeiro a abril;
- O patógeno é capaz de infectar flores, permanecer latente em frutos verdes e provocar sintomas em frutos imaturos, podendo causar danos em pós-colheita.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho evidenciou a importância da doença, antracnose do caqui, na região metropolitana de Curitiba. Demonstrou que a doença pode inviabilizar a produção de caquis orgânicos, indicando a necessidade urgente de táticas de manejo visando o seu controle. Dentre as táticas de manejo já existentes algumas poderiam ser utilizadas para reduzir o impacto desta importante doença, entretanto muitas pesquisas ainda devem ser realizadas em campo e em laboratório para desenvolvimento de estratégias de manejo bem como para esclarecer algumas dúvidas sobre a epidemiologia deste patógeno na região de estudo e também em outras áreas produtoras da cultura do caqui. Dentre as práticas comuns para a fruticultura poderiam ser recomendadas para os produtores: Tratamento de inverno com produtos a base de cobre, poda de inverno para abertura da copa e retirada de cancrios, que serão fonte de inóculo inicial, poda verde para manutenção das plantas bem arejadas e eliminação de possíveis cancrios formados no começo do ciclo pela infecção em ramos do ano, Tratamento com fungicidas no início do ciclo vegetativo até lignificação dos ramos, tratamento com fungicidas no período reconhecido como queda de frutos sintomáticos.

A continuidade dos estudos sobre esta doença e principalmente a busca por cultivares resistentes são de grande importância para a sustentabilidade da cultura na região metropolitana de Curitiba e poderá ser muito útil para outras regiões nas quais a doença também ocorre.

8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. C. C.; COELHO, R. S. B. Caracterização da Agressividade de Isolados de *Colletotrichum* de Maracujá Amarelo com Marcadores Bioquímico, Fisiológico e Molecular. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 318-328, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHAG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfofocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 21-31, 2007.
- CANNON PF, DAMM U, JOHNSTON PR, WEIR BS *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology** , v. 73, p. 181–213, 2012.
- CARBONE, I. M.; KOHN, M. L. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, p. 553-556, 1999.
- CORSATO, C. E.; SCARPARE FILHO, J. A.; VERDIAL M. F. Fenologia do caquizeiro "Rama Forte" em clima tropical. **Bragantia**, v. 64, p. 323-329, 2005.
- DAMM, U; CANNON, P.F; WOUDEMBERG, J.H.C; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 37–113, 2012.
- DAMM, U; CANNON, P.F; WOUDEMBERG. J.H.C; JOHNSTON, P.R; WEIR, B.S; TAN, Y.P; SHIVAS, R.G; CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1–36, 2010.
- DA SILVA, S. G. Persimmon anthracnose. **Biológico**, v. 6, p. 125-126, 1940.
- DIAS , M. D.; POZZA, E. A.; ABREU, M. S.; MIRANDA, E. O. Efeito da temperatura no crescimento, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 29, p. 545-552, 2004.
- FAO. **FAOSTAT**: Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso: 22/01/2010.
- GARIBALDI A.; BERTETTI D.; AMATULLI, M. T.; GULLINO M. L. First report of postharvest fruit rot in persimmon caused by *Phacidiopycnis washingtonensis* in Italy. **Plant Disease**, v. 94, p. 788-788, 2010.
- GIN RAZZOUK, P. L. **Avaliação fenológica de dez cultivares de caquizeiro *Diospyros kaki* L. e propagação por estaca em regiões tropicais**. 104f. Dissertação (mestrado em sistemas de produção) - Campus de Ilha Solteira, Universidade estadual de São Paulo, São Paulo, 2007.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P.W.; *Colletotrichum* –names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147–182, 2009.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST F. Mrbayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755. 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br> > Acesso em 22/01/2012.

KRAMMES, J. G. Estabelecimento de índices de maturação para o ponto de colheita de frutos de caqui Fuyu. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, p. 62-66, 2007.

LUO Y.; MICHAILIDES T. J. Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, v. 91, p. 864-72, 2001.

MARTINS, F. P.; PEREIRA, F. M. **Cultura do caqui**. São Paulo: Funep, 71p., 1989.

MOWAT, A. D.; GEORGE, A. P. Persimmon. In: SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P. C. (Ed.). **Handbook of environmental physiology of fruit crops: temperate crops**. Boca Raton: CRC Press, v. 1, cap.8, p.209-232. 1994.

MOWAT, A. D.; GEORGE, A. P.; COLLINS, R.J. Cultivation of persimmon (*Diospyros kaki* L.) **Acta Horticulturae**, v. 409, p. 141-149, 1995.

MYLLYS L, STENROOS S, THELL A. New genes for phylogenetic studies of lichenized fungi: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-tubulin genes. **Lichenologist**, v. 34, p. 237–246, 2002

NILSSON, R. H.; RYBERG, M.; KRISTIANSSON, E.; ABARENKOV, K.; LARSSON, K. H.; KÖLJALG, U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungalperspective. **Plos one**, v. 1, p. 59-59. 2006.

PARIKKA, P.; LEMMETTY, A. Tracing latent infection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry by PCR: **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 393-398, 2004.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE E. H. C.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 33-43, 2010.

PALOU, L.; MONTESINOS-HERRERO, C.; GUARDADO, A.; BESADA, C.; DEL RÍO, M. A. Fungi associated with postharvest decay of persimmon in Spain. **Acta Horticulturae**. v. 833, p. 275-280, 2009.

PIO, R. A cultura do caqui. Piracicaba: ESALQ/USP, 35p, 2003. (Série Produtor Rural, n. 22).

R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, disponível em < <http://www.R-project.org>>.

SATO, G. S.; ASSUMPÇÃO, R. Mapeamento e análise da produção do caqui no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v. 32, p. 47-54, 2002.

SEAB/DERAL. Secretaria da Agricultura e Abastecimento/ Departamento de Economia Rural. Análise da conjuntura agropecuária-fruticultura. Disponível em: < http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2011_12.pdf> Acesso em 19/07/2012

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, n. 67 p. 1051-1056, 1977.

SIVANATHAN, S.; ADIKARAM, N. K. B.; Latency of infection in unripe avocados by *Colletotrichum gloeosporioides* is not due to inadequate enzyme potential. **Journal of Phytopathology**, n. 125 p. 110–116, 1989.

SILVA, K. S; REBOUÇAS, T. N. H.; LEMOS, O. L.; BOMFIM, M. P.; BOMFIM A. A.; ESQUIVEL, G. L.; BARRETO, A. P. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; DIAS, N. O.; TAVARES, G. M.; Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies de frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 131-133, 2006.

SIMÃO, S. Caquizeiro. In: Simão, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: Fealq, p. 382-402, 1998.

SWOFFORD, D. L. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.00. Sinauer Associates, Sunderland, MA 1998.

SUN, H.; ZHANG, J. Z.; ZHANG, L. L.; HYDE K.D. Construction and characterization of a genomic library of *Colletotrichum horii* from persimmon. **Plant Pathology & Quarantine**, v. 2, p. 1-8, 2012.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TOZZE JUNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JUNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum spp.* causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 77-79, 2006.

XIE, L.; ZHANG, J.; CAI, L.; HYDE, D. Biology of *Colletotrichum horii*, the causal agent of persimmon anthracnose. **Mycology**, v. 1, p. 242 - 253, 2010.

WEIR, B. S.; JONHSTON, P. R. Characterisation and neotypification of *Gloeosporium kaki* Hori as *Colletotrichum horii*. **Mycotaxon**, v. 111, p. 209-219, 2010.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

Weir, B.S; Johnston, P.R.. Towards a secondary fungal barcode for *Colletotrichum* [Sordariomycetes, Ascomycota]. Forth international barcode of life conference, Adelaide Australia, 2011.

WILLIAMSON, S. M.; SUTTON, T. B.; First report of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on persimmon fruit in the United States. **Plant disease**, v. 94, p. 634.1 - 634.1, 2010.

WHITE, T. M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**, p. 315–321, 1990.

YANG, Y.; WANG, R.; LI, G; RUAN, X. Observation of persimmon anthracnose in the national field genebank for persimmon. **Acta Horticulturae**, v. 833, p. 109-112, 2009.

ZAITLIN, B; ZEHR, E.; DEAN, R. Latent infection of peach caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*. **Canadian Journal of Pathology-Revue Canadienne Phytopathology**, v. 22, p. 224-228, 2000.